

Jure Boras

**Sinteza i karakterizacija novih urea primakina s
aminoalkoholima**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutska kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Zrinke Rajić.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Zrinki Rajić na pruženoj prilici, pomoći i usmjeravanju za vrijeme cijelog procesa izrade, a posebno na velikom strpljenju tijekom dugog razdoblja pisanja ovog rada.

Veliko hvala dr. sc. Kristini Pavić na iznimnoj pomoći u laboratorijskom radu, na rješavanju spektara te na pažljivom čitanju i savjetima za poboljšanje ovog diplomskog rada.

Hvala lijepa i doc. dr. sc. Ivani Perković na korisnim savjetima i pomoći u radu. Hvala i kolegama Hrvoju Boiću, Goranu Poji i Zvonimiru Mlinariću na kolegijalnoj pomoći, pjesmi i smijehu.

Hvala svim prijateljima i obitelji na podršci na ovom putu.

Posebno se želim zahvaliti roditeljima na omogućavanju školovanja i na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tijekom studija.

KRATICE

ATR	atenuirana totalna refleksija
Btc	benzotriazolkarbonilna skupina
BtcCl	klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline
BtH	benzotriazol
DMSO	dimetilsulfoksid
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija
DTA	diferencijalna termička analiza
EM	elektromagnetsko zračenje
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
FT-IR	infracrvena spektrometrija uz fourierovu transformaciju
GIT	gastrointestinalni trakt
HPLC-MS/MS	tehnika vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemske masene spektrometrije
IR	infracrveno elektromagnetsko zračenje
KMB	krvno-moždana barijera
<i>LD</i> ₅₀	doza letalna za 50% jedinki
log <i>P</i>	logaritam particijskog koeficijenta
MS	masena spektrometrija
MW	mikrovalovi, mikrovalno elektromagnetsko zračenje
NCA	<i>N</i> -karboksianhidrid
NSAIL	nesteroidni porotuuupalni lijek
Pd/C	paladij na ugljenu
P-gp	P-glikoprotein
PHEA	poli[a,b-(<i>N</i> -2-hidroksietil-DL-aspartamid)]
PHPA	poli[a,b-(<i>N</i> -3-hidroksipropil-DL-aspartamid)]
PSA	ploština zone polarne površine
SW 620	humana stanična linija adenokarcinoma debelog crijeva
TEA	trietilamin
TGA	termogravimetrijska analiza
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna kromatografija

TMS	tetrametilsilan
TPSA	topološka ploština zone polarne površine
UV	ultraljubičasto elektromagnetsko zračenje
WDI	Svjetski indeks lijekova
WLOGP	logaritam particijskog koeficijenta izračunat prema metodi objavljenoj u radu Wildmana i Crippena iz 1999.
XLOGP3	logaritam particijskog koeficijenta izračunat korištenjem programa XLOGP 3.2.2.
n.p.	nije primjenjivo

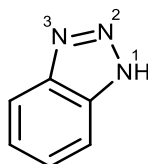
SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Benzotriazol kao alat u organskoj sintezi.....	2
1.2. Mikrovalno zračenje u organskoj sintezi.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	21
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. Sintaza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl) (1).....	25
3.2. Sintaza benzotriazolida primakina (N-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-karboksamid) (2)	25
3.3. Sintaza urea derivata primakina 3a-d	25
3.3.1. Sintaza 3-[1-(hidroksimetil)ciklopropil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil} uree (3a)	26
3.3.2. Sintaza 3-[1-(hidroksimetil)ciklobutil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil} uree (3b)	26
3.3.3. Sintaza 3-[(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-Hidroksiciklopentil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil} uree (3c).....	27
3.3.4. Sintaza 3-[2-(4-Hidroksifenil)etil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil} uree (3d).....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
5. ZAKLJUČAK.....	40
6. LITERATURA	42
7. SAŽETAK / SUMMARY	51
8. PRILOZI	54

1. UVOD

1.1. Benzotriazol kao alat u organskoj sintezi

Benzotriazol (BtH, Slika 1) je zbog svojih povoljnih kemijskih i fizikalnih svojstava često upotrebljavan reagens u organskoj sintezi. Na sobnoj temperaturi je kristalinična krutina bez okusa i mirisa. Korištenjem termogravimetrijske analize (TGA), diferencijalne termičke analize (DTA) i diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) potvrđeno je da mu je pri atmosferskom tlaku talište 100 °C, a vrelište oko 350 °C, dok do raspada dolazi tek u rasponu od 306 °C do 410 °C (Katritzky i sur., 2006a). Kemijski je također vrlo otporan, pa tako ostaje stabilan u vrućoj koncentriranoj sumpornoj kiselini i rastaljenom kalijevom hidroksidu, kao i u prisutnosti vrlo jakih reducensa (litijev aluminijev hidrid) i oksidansa (kalijev permanganat) (Katritzky, 2002).



Slika 1. 1*H*-benzotriazol.

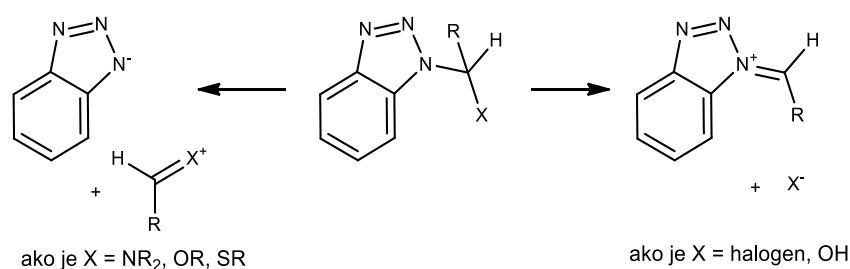
Za praktičnu laboratorijsku upotrebu nekog spoja bitno je razmotriti i opasnost koju on predstavlja za ljude i okolinu. BtH u kontaktu s kožom i očima te prilikom udisanja njegove prašine dovodi do iritacija, međutim to čini većina laboratorijskih kemikalija korištenih u organskoj sintezi. U usporedbi s drugim kemikalijama relativno je netoksičan prilikom oralne ingestije, o čemu svjedoči doza smrtonosna za 50 % isptivanih jedinki (LD_{50}) koja u zamorca iznosi 500 mg/kg. Taj se povoljni toksikološki profil može djelomično pripisati i njegovoj slaboj topljivosti u vodi (Material Safety Data Sheet, www.sciencelab.com).

BtH se ponaša i kao slaba Brönstedova kiselina ($pK_a = 8,2$) otpuštanjem protona s položaja 1, tj. 3, i kao jako slaba baza ($pK_a < 0$) hvatanjem protona slobodnim elektronskim parom jednog od neprotoniranih dušika triazolskog prstena (Katritzky, 2002).

A. R. Katritzky, znanstvenik koji je dao najveći obol benzotriazolskoj kemiji (Zorc i sur., 2012), opisao je 1998. godine zahtjeve koje bi trebao ispunjavati idealan „sintetski pomoćnik“. Kiselo-bazna svojstva čine BtH pogodnim za jednostavnu ekstrakciju i uklanjanje iz reakcijske smjese nakon sinteze (otopinom Na_2CO_3 ili HCl), čime ispunjava prvi zahtjev

za dobre sintetske reagense. Ovim se postupkom može i reciklirati. Drugi zahtjev, koji BtH također ispunjava, jest sposobnost jednostavnog uvođenja u molekulu. Treći ispunjeni zahtjev je stabilnost tijekom različitih kemijskih operacija. Pogodna karakteristika je i relativno niska cijena. Međutim, presudna osobina BtH koja ga definira kao iznimno koristan alat u sintezi jest sposobnost aktiviranja početnog reaktanta za njegovu kemijsku pretvorbu, tj. djelovanje poput aktivirajuće skupine (Katritzky i sur., 1998).

N-susptituirani derivati BtH imaju zanimljiva svojstva. U sustavima gdje je heteroatom (najčešće N, O ili S) vezan na isti ugljikov atom kao i BtH, BtH može, ovisno o okruženju u molekuli, posjedovati i elektron-donorska i elektron-akceptorska svojstva. Zbog toga takvi sustavi mogu ionizirati na dva načina: tvoreći benzotriazolski anion te imonij, oksonij odnosno tionij kation ili dajući anionsku speciju heteroatoma i kation benzotriazola (Shema 1). Prvi će način ionizacije biti vjerojatniji kada je heteroatom u pitanju dušik, sumpor ili kisik u obliku alkoksi skupine, a drugi kada je X dobra izlazna skupina, npr. halogen (Katritzky i sur., 1998; Katritzky i sur., 1991).



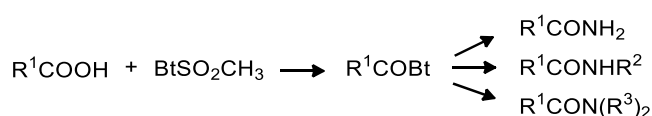
Shema 1. Ionizacija *N*-supstituiranih derivata benzotriazola (Katritzky i sur., 1998).

BtH posjeduje sposobnost aktiviranja α -CH skupine za otpuštanje protona sličnu onoj cijano i fenilsulfonilnih skupina, a bolju sposobnost aktiviranja α -CH skupine za otpuštanje protona i bolja elektron-donorska svojstva od fenilnih i vinilnih skupina (Katritzky i sur., 1998). Kao izlaznu ga skupinu možemo usporediti s halogenima. Međutim, halogenirani derivati amina ili etera predstavljaju značajnu opasnost za zdravlje ljudi, a često su i prerekativni za praktičnu laboratorijsku primjenu. Benzotriazolski su derivati, pak stabilni, nehlapljivi i jednostavni za pripremu (Katritzky i sur., 1998; Katritzky i sur., 1994).

Osim navedenih, zabilježeni su i drugi mehanizmi aktivacije i načini uvođenja BtH u molekulu (Katritzky i sur., 1995; Katritzky i sur., 1990; Katritzky, 1999; Katritzky i sur.

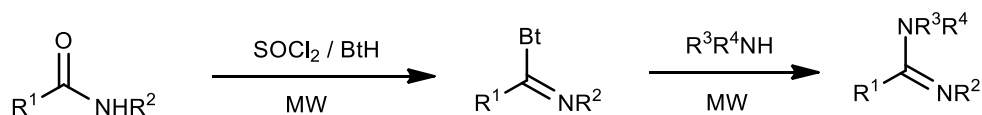
1998b) što omogućuje njegovo korištenje u velikom broju sintetskih postupaka. Napredak benzotriazolske kemije i širenje područja primjenjivosti jasno se može vidjeti u plodovima višedesetljetnog rada grupe Alana Katritzkog (Ramsden i Scriven, ured., 2016). Ovdje su predstavljeni samo neki od primjera korištenja benzotriazola u sintezi.

N-acilbenzotriazoli, dobiveni reakcijom između karboksilnih kiselina i *N*-(1-metilsulfonyl)benzotriazola, mogu reagirati s amonijevim hidroksidom, primarnim ili sekundarnim aminima dajući primarne, sekundarne ili tercijarne amide s visokim iskorištenjem (Shema 2) (Katritzky i sur., 2002).



Shema 2. Sintaza amida korištenjem *N*-(1-metilsulfonyl)benzotriazola (Katritzky i sur., 2002)

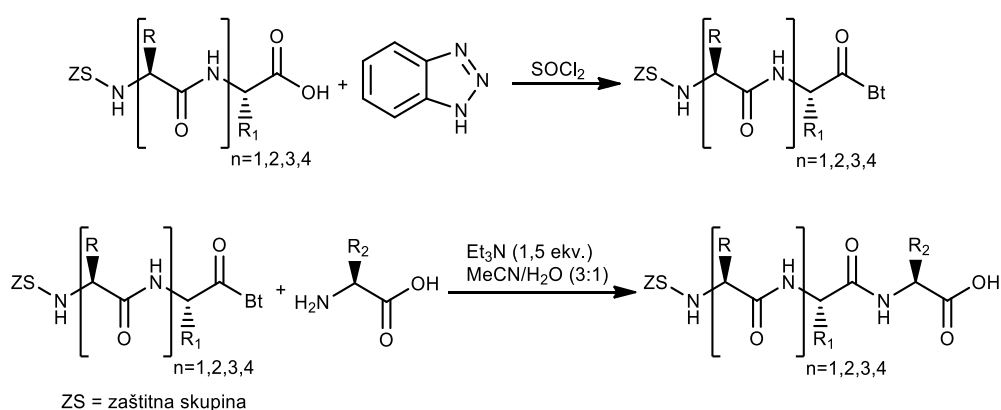
Tako dobiveni sekundarni amidi mogu u reakciji s tionil-kloridom i BtH pri 80 °C uz mikrovalno zračenje (MW) dati amidin benzotriazola, koji zatim mogu s aminima dati željene amidine (Shema 3) (Katritzky i sur., 2006b).



Shema 3. Sintaza amidina benzotriazolskom metodom (Katritzky i sur., 2006b).

Mnogi su spojevi dobiveni acilacijom i arilacijom uz BtH kao sintetski alat (Katritzky i sur., 2002; Katritzky i sur., 2004; Katritzky i sur., 2005b). Pokazane su i metode alkilacije na ugljikovom atomu i na heteroatomu (Katritzky i sur., 2005a). Velik doprinos benzotriazolske kemije vidljiv je i u području sinteze heteromonocikličkih (Katritzky i Rachwal, 2009) i heterobicikličkih (Katritzky i Rachwal, 2011) spojeva, što zahtjeva korištenje različitih derivata BtH i odvija se uz različite mehanizme reakcija (Ramsden i Scriven, ured., 2016).

Kruna razvoja benzotriazolske kemije ogleda se u njenoj upotrebi za sintezu peptida i peptidnih biokonjugata (Ramsden i Scriven, ured., 2016). Kod sinteze peptida može se koristiti benzotriazolska skupina kao aktivator karboksilne skupine aminokiselina ili peptida čija je amino skupina, odnosno amino kraj zaštićen. Reakcija se s BtH tada odvija uz tionil-klorid, a dobiveni produkt može uz visoko iskorištenje reagirati s različitim aminokiselinama (Shema 4) (Bajaj i sur., 2012).

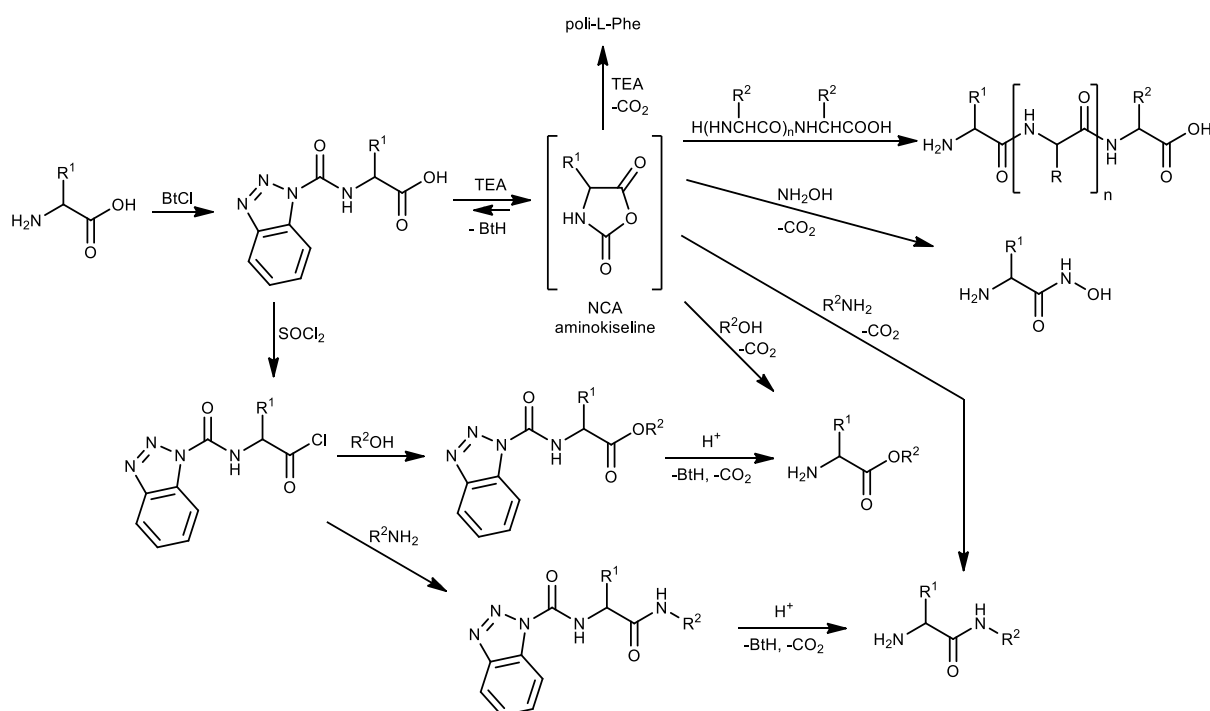


Shema 4. Sinteza *N*-zaštićenih peptida uz BtH (Bajaj i sur., 2012).

Jedan od derivata BtH koji je godinama proučavan i korišten u sintezama u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta je klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl), koji je isprva sintetiziran reakcijom BtH s fozgenom u omjeru 1:1 (Butula i sur., 1977), a kasnije je razvijena sigurnija metoda s trifozgenom (Butula i Jadrijević-Mladar Takač, 2000). Danas je spoj i komercijalno dostupan (Zorc i sur., 2012).

BtcCl je korišten u reakcijama s različitim aminima, hidrazinima i alkoholima, a produkti reakcija su dalje spremno reagirali s aminima uz prikladne uvjete: pri sobnoj temperaturi za bazičnije amine, a pri povišenoj temperaturi uz dulje trajanje reakcije za slabije nukleofile (Zorc i sur., 2012). Dobivene su različite uree, semikarbazidi, karbazidi i karbamati (Butula i sur., 1977; Butula i sur., 1978). BtcCl je uspješno upotrijebljen i u sintezi benzoksazinskih, kinazolinskih i triazinskih derivata te derivata hidroksiurea (Butula i Jadrijević-Mladar Takač, 2000; Butula i sur., 1981). Reakcije s aminokiselinama omogućile su primjenu BtcCl u peptidnoj kemiji i u sintezi hidantoina i ureidoamida (Butula i sur., 1981; Opačić i sur., 2005.; Rajić i sur., 2006).

U sintezi peptida benzotriazolkarbonilna (Btc) skupina korištena je kao *N*-zaštitna, *N*-aktivirajuća i istodobno kao *N*-zaštitna i *C*-aktivirajuća (Shema 5). Zaštitna Btc skupina upotrijebljena za sintezu estera i amida aminokiselina s *N*-kraja jednostavno se uklanja trifluoroctenom ili razrijeđenom HCl pri sobnoj temperaturi (Zorc i sur., 1990). Dvostruka uloga Btc kao *N*-zaštitne i *C*-aktivirajuće skupine ostvarena je stvaranjem međuprodukta anhidrida *N*-karboksiaminokiseline (NCA aminokiseline) uz TEA (Zovko i sur., 2003). Tim su putem nastali derivati aminokiselina sa slobodnom amino skupinom: amidi, esteri, di- i tripeptidi te hidroksamske kiseline (Zorc i sur., 1990; Muskolaj i sur., 1997; Butula i sur., 1983; Matijević-Sosa i sur., 1985).



Shema 5. Btc skupina kao *N*-zaštitna, *N*-aktivirajuća i istovremeno *N*-zaštitna i *C*-aktivirajuća (prilagođeno prema Zorc i sur., 2012; Butula i Zorc, 2007).

Konjugacija postojećih lijekova s aminokiselinama, peptidima ili drugim organskim molekulama popularan je način poboljšanja njihovih djelovanja. Benzotriazolske su metode korištene u sintezi mnogih takvih konjugata. Nekolicina antibiotika slabe permeabilnosti kroz stanični zid uspješno je konjugirana s aminokiselinama uz zadržavanje kiralnosti, što im je u nekim slučajevima povećalo antibakterijsku aktivnost (Ibrahim i sur., 2014). Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAIL) također su aktivirani pomoću BtH i konjugirani s aminokiselinama i peptidima. Zbog poznate gastrointestinalne toksičnosti tih lijekova (Salvo i

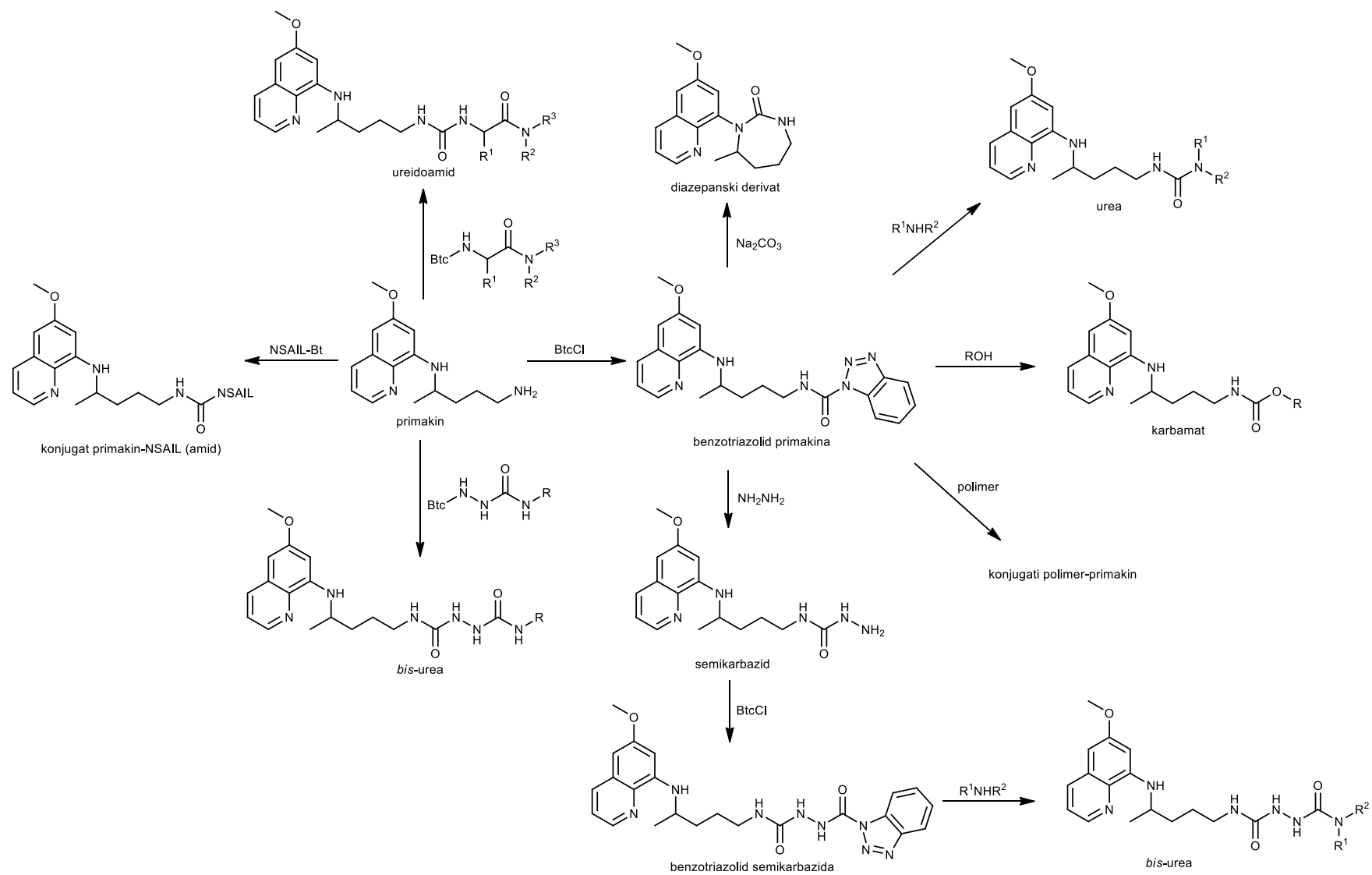
sur., 2011), jedan od odabranih dipeptida za konjugaciju bio je karnozin, lijek koji se samostalno, ili u obliku kompleksa s cinkom, koristi protiv ulceracija gastrointestinalne sluznice (Matsukura i Tanaka, 2000). Povezivanje NSAIL-a i paracetamola aminokiselinskim mostom uz korištenje BtH dalo je produkte koji su kod štakora imali snažnije protuupalno djelovanje i manje nuspojava u odnosu na izvorne lijekove (Tiwari i sur., 2014). Pomoću BtH pripremljeni su i konjugati različitih lijekova s polimerima poliaspartamidnog tipa, čime se može postići povećana topljivost, produljeno oslobađanje, povećana stabilnost, manja toksičnost i ciljno djelovanje lijeka (Rajić i sur., 2009; Butula i Zorc, 2007; Zorc i sur., 2012).

Predmet istraživanja u Zavodu za farmaceutsku kemiju posljednjih desetak godina jest dizajn i sinteza novih derivata antimalarijskog lijeka primakina s ciljem poboljšanja njegovog citostatskog djelovanja. Većina derivata sintetizirana je pomoću benzotriazolske metode, a primijenjena su dva osnovna sintetska pristupa (Džimbeg i sur., 2008; Šimunović i sur., 2009; Rajić i sur., 2009; Rajić i sur., 2010; Perković i sur., 2013; Pavić i sur., 2014; Perković i sur., 2016; Pavić i sur., 2016; Pavić i sur., 2018).

U prvom sintetskom pristupu početni je spoj, benzotriazolid primakina, dobiven reakcijom primakina s BtCl. Taj je prekursor zatim poslužio u sintezi urea (Džimbeg i sur., 2008; Šimunović i sur., 2009; Pavić i sur., 2014), karbamata (Šimunović i sur., 2009) i konjugata polimera i primakina (Rajić i sur., 2009). Uree primakina dobivene su reakcijama aminolize benzotriazolida primakina odgovarajućim aminima i aminoalkoholima, karbamati su pripremljeni reakcijama s alkoholima, a polimerni konjugati reakcijom s prethodno pripremljenim PHEA i PHPA. Diazepanski derivat nastao je ciklizacijom benzotriazolida primakina u bazičnim uvjetima (Šimunović i sur., 2009).

U nastavku je sintetiziran semikarbazid primakina reakcijom benzotriazolida primakina i hidrazina. Nastali semikarbazid je spremno ponovno reagirao s BtCl dajući odgovarajući benzotriazolid, koji je potom upotrijebljen za sintezu *bis*-urea (karbamoilsemikarbazida) primakina reakcijom s aminima (Pavić, 2017).

Drugi sintetski pristup započeo je sintezom benzotriazolida NSAIL-a, amida *N*-(1-benzotriazolkarbonil)aminokiselina i 1-(1-benzotriazolkarbonil)-4-cikloalkil/aril semikarbazida. Oni su zatim reagirali s primakinom dajući konjugate NSAILa i primakina (Rajić i sur., 2010), ureidoamide, odnosno *bis*-uree primakina (Perković i sur., 2013; Pavić, 2017). Pregled sinteza primakinskih derivata pripremljenih u Zavodu za farmaceutsku kemiju prikazan je na Shemi 6.



Shema 6. Sinteza primakinskih derivata u Zavodu za farmaceutsku kemiju (prilagođeno prema Zorc i sur., 2012; Pavić, 2017).

1.2. Mikrovalno zračenje u organskoj sintezi

Od 1986. godine i prvog rada koji opisuje korištenje mikrovalnog zračenja u organskoj sintezi (Gedye i sur., 1986), interes znanstvenika za tu tehniku ne jenjava (Driowya i sur., 2016). Mikrovalno zračenje postalo je toliko uobičajeno u laboratorijskoj praksi da je mikrovalni reaktor već prozvan „Bunsenovim plamenikom 21. stoljeća“ (Kappe i sur., 2012). Glavni razlozi takvog zanimanja jest zamijećeno ubrzanje reakcija više od tisuću puta u odnosu na konvencionalne tehnike zagrijavanja (Gedye i sur., 1986), bolje iskorištenje i manji udio onečišćenja (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005).

Mikrovalno (MW) zračenje je elektromagnetsko (EM) zračenje u području frekvencija 0,3 – 300 GHz, odnosno valnih duljina 1 mm – 1 m, što znači da se po frekvencijama nalazi između infracrvenog zračenja (IR) i radiovalova (<http://en.wikipedia.org/>). Kako se EM zračenje u tom području široko koristi za prijenos informacija ili energije, gotovo sve kućne mikrovalne pećnice, kao i one za znanstvenu upotrebu, rade, u svrhu izbjegavanja interferencija, isključivo na frekvenciji od 2,45 GHz (Kappe i sur., 2012). Ta frekvencija odgovara energiji fotona od $1,01 \times 10^{-5}$ eV, što je puno niže od energije kemijskih veza, pa niti mehanizam djelovanja MW zračenja ne može biti kidanje kemijske veze, kao što je to slučaj kod ultraljubičastog ili vidljivog zračenja (Tablica 1.; Nüchter i sur., 2004; Kappe i sur., 2012).

Tablica 1. Usporedba tipičnih frekvencija i energija fotona u EM spektru s energijama kemijskih veza (preuzeto iz Zrinski i Eckert-Maksić, 2005).

Vrsta EM zračenja	Tipična frekvencija (MHz)	Energija fotona (eV)	Tip kemijske veze	Energija veze
Gamma	$3,0 \times 10^{14}$	$1,24 \times 10^6$	H–OH	5,2
X-zrake	$3,0 \times 10^{13}$	$1,24 \times 10^5$	H–CH ₃	4,5
UV	$1,9 \times 10^9$	4,1	H–NHCH ₃	4,0
Vidljiva svjetlost	$6,0 \times 10^8$	2,5	H ₃ C–CH ₃	3,8
IR	$3,0 \times 10^6$	0,012	PhCH ₂ –COOH	2,4
MW	2450	0,0016	Vodikova veza	0,21
Radio	1	4×10^{-9}		

Temeljni princip djelovanja MW zračenja na ubrzanje kemijskih reakcija je „MW dielektrično zagrijavanje“. Ono je posljedica sposobnosti materijala (npr. otapala i reagensa) da apsorbira MW zračenje koje proizvodi MW reaktor i pretvori ga u toplinu (Kappe i sur., 2012). Električna komponenta MW zračenja uzrokuje zagrijavanje uzorka na dva načina: rotacijom dipola i ionskom vodljivosti (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005).

Da bi molekula mogla apsorbirati MW zračenje i pretvoriti ga u toplinu, ona mora imati stalni ili inducirani dipolni moment. Dipoli izloženi MW zračenju se pokušavaju reorijentirati tako da se njihov dipolni moment smjerom poklapa s vektorom izmjeničnog električnog polja (\vec{E}), koje promijeni svoj smjer svakih 0,2 ns. Nekada njihova rotacija nije dovoljno brza i zato se ne uspiju potpuno reorijentirati i poklopiti se s \vec{E} , prije nego što promijeni svoj smjer. To dovodi do prijelaza energije u toplinsku energiju uslijed molekulskog trenja i međumolekulskih sudara (Kappe i sur., 2012; Gabriel i sur., 1998).

Drugi bitni mehanizam zagrijavanja, ionska vodljivost, javlja se ukoliko su u mediju prisutni slobodni ioni ili ionske vrste. Tijekom iradijacije takve vrste osciliraju naprijed-nazad pod utjecajem MW polja i udaraju o susjedne molekule i atome, povećavajući time njihovu brzinu kretanja, tj. temperaturu medija. Ovaj mehanizam ima veću sposobnost generiranja topline od rotacije dipola, a učinak je to jači što je materijal bogatiji ionskim vrstama (Kappe i sur., 2012).

Sličan se učinak javlja i u vodljivim i poluvodljivim materijalima poput metala, međutim u tom slučaju dolazi do toka elektrona na površini materijala i do zagrijavanja zbog omskog otpora (Bogdal i Prociak, 2007). U organskoj je sintezi ovo relevantno zbog tankih metalnih filmova (zlato, paladij), grafita i silicijevog karbida kao pomoćnih materijala za brže zagrijavanje (Kappe i sur., 2012).

Jakost interakcije materije (krutina ili tekućina) s MW zračenjem određena je njenim dielektričnim svojstvima: dielektričnom konstantom (ϵ'), dielektričnim gubitkom (ϵ'') i tangensom gubitka ($\tan \delta$) (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005). Dielektrična konstanta opisuje polarizabilnost molekula materijala u električnom polju, dielektrični gubitak opisuje učinkovitost pretvaranja EM zračenja u toplinu, a tangens gubitka ($\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$) služi kao jednostavan parametar za usporedbu brzina zagrijavanja materijala slične ϵ' (Kappe i sur., 2012; Gabriel i sur., 1998). Svi navedeni parametri ovise o karakteristikama materije, temperaturi i frekvenciji zračenja (Gabriel i sur., 1998).

Za primjenu MW zračenja u organskoj sintezi iznimno je bitno poznavanje dielektričnih parametara otapala u kojima se reakcija odvija. Otapala se prema vrijednosti $\tan \delta$ mogu svrstati u: visoko ($\tan \delta > 0,5$), srednje ($0,5 > \tan \delta > 0,1$) i nisko apsorbirajuća ($\tan \delta < 0,1$) (Hayes, 2002). Pregled vrijednosti $\tan \delta$ najčešće korištenih otapala dan je u Tablici 2. Druga često korištena otapala bez stalnog dipolnog momenta, poput tetraklorugljika, benzena ili dioksana su gotovo u potpunosti propusna za MW zračenje ($\tan \delta < 0,01$), što ih ipak ne diskvalificira za uporabu u reakcijama grijanim u mikrovalnim reaktorima jer ponekad i dovoljno polarni reagensi ili katalizatori mogu osigurati da ukupna dielektrična svojstva medija budu povoljna za MW zagrijavanje (Kappe i sur., 2012).

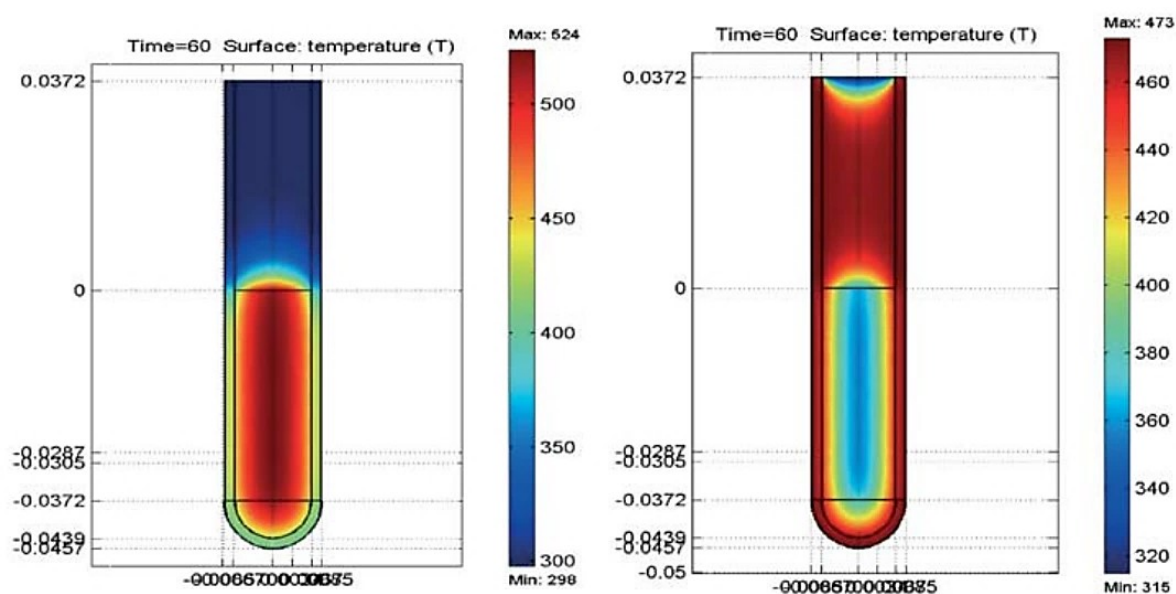
Tablica 2. Tangens gubitka ($\tan \delta$) nekih često korištenih otapala pri 2,45 GHz i 20 °C (Hayes, 2002).

Otapalo	$\tan \delta$	Otapalo	$\tan \delta$
etilen-glikol	1,350	voda	0,123
etanol	0,941	kloroform	0,091
DMSO	0,825	acetonitril	0,062
mravlja kiselina	0,722	etil-acetat	0,059
metanol	0,659	aceton	0,054
1,2-diklorbenzen	0,280	THF	0,047
octena kiselina	0,174	toluen	0,040
DMF	0,161	heksan	0,020

Jedan od bitnih faktora MW zagrijavanja je dubina penetracije zračenja. Ona je obrnuto proporcionalna tangensu gubitka i zato će kod materijala s visokim $\tan \delta$ vanjski slojevi apsorbirati svo zračenje (Mingos i Baghurst, 1991). Ako se penetracija definira kao debljina sloja prolazom kroz kojeg snaga zračenja padne na 37 % originalne (Nüchter i sur., 2004), u vodi će ona na sobnoj temperaturi iznositi samo 1,4 cm. To sugerira da je prilikom zagrijavanja velikih volumena uzoraka samo površinski sloj pod direktnim utjecajem dielektričnog grijanja, dok dublji slojevi toplinu dobivaju konvekcijom i kondukcijom iz površinskih slojeva (Kappe i sur., 2012).

Volumeni smjesa i posude koje se u praksi koristi u laboratorijskoj MW sintezi, omogućuju da se cijela smjesa zagrijava jednoliko dielektričnim zagrijavanjem. To je velika prednost u

odnosu na konvencionalne tehnike zagrijavanja reakcijske smjese kod kojih se toplina prvo prenosi s izvora topline (najčešće kupelji) na stijenku posude, a tek zatim na otapalo i reaktante. Kao što je vidljivo na Slici 2 (desno), kod zagrijavanja u kupelji, stijenka je, zbog niske termičke provodljivosti, toplija od reakcijske smjese, a do uravnoteženja može proći i nekoliko sati (Schanche 2003; Zrinski i Eckert-Maksić, 2005). Kod MW zagrijavanja (Slika 2, lijevo) stijenka je propusna za MW zračenje ($\tan \delta$ borosilikatnog stakla iznosi 0,001), pa se javlja obrnuti temperaturni gradijent, tj. smjesa je toplija od stijenke epruvete. Osim bržeg i uniformnijeg zagrijavanja, to za posljedicu ima i smanjenu vjerojatnost raspada kemikalija ili inaktivacije katalizatora u kontaktu s vrućom stijenkom i mogućnost kontroliranog zaustavljanja prijenosa topline isključivanjem izvora MW zračenja (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005; Kappe i sur., 2012).



Slika 2. Temperaturni profil smjese grijane MW zračenjem (lijevo) i uljnom kupkom (desno) nakon 60 s (preuzeto iz Schanche, 2003).

Mikrovalni učinci

Sinteza uz korištenje mikrovalova donijela je spektakularno poboljšanje u povećanju iskorištenja reakcija i smanjenju njihova trajanja u odnosu na konvencionalne tehnike zagrijavanja (de la Hoz i sur., 2005). U nekim je slučajevima dobivena i drugačija kvantitativna raspodjela produkata ili su dobiveni sasvim novi produkti (Jacob i sur., 1995). Takvi su rezultati naveli znanstvenike na špekuliranje o postojanju tzv. netermičkih mikrovalnih učinaka (npr. Langa i sur., 1997), koji bi bili posljedica direktnog djelovanja

mikrovalova na sastavnice reakcijske smjese, neposredovanog povišenjem temperature (Kappe i sur., 2012).

Neki od predloženih mehanizama (Binner i sur., 1995) netermičkog učinka su reorijentacija dipolarnih molekula u smjeru električnog polja, čime se mijenja predeksponencijalni faktor A zbog povoljnije međusobne orijentacije molekula za uspješan sudar, ili se smanjuje energija aktivacije E_a u Arrheniusovoj jednadžbi zbog smanjenja entropije uslijed povećane organizacije molekula (Berlan i sur., 1992):

$$k = A \times e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

gdje je k –konstanta brzine reakcije, A –predeksponencijalni (frekvencijski) faktor, E_a –energija aktivacije, R –plinska konstanta, T –apsolutna temperatura.

Međutim, novija su istraživanja pokazala da u velikom broju znanstvenih radova, koji su zapazili razlike u brzini reakcija, iskorištenju, produktima i sl., temperatura u mikrovalnom reaktoru nije mjerena na način koji bi omogućio pouzdanu usporedbu s temperaturama izmjerenim u kupelji (Kappe i sur., 2012). Većina znanstvenika stoga smatra da netermički učinci vjerojatno ne postoje, ali da zbog rastuće važnosti MW sinteze i radi probijanja ove tehnike u industriju treba provesti dodatna istraživanja koja bi na kvantno-kemijskoj razini rasvijetlila pitanje postojanja netermičkih učinaka (Leadbeater, ured., 2011). Osnovni je učinak u pozadini značajnog ubrzanja reakcija korištenjem MW jako trenutačno zagrijavanje, koje omogućuje brzo dostizanje visoke temperature cijele smjese, povećanje brzine molekula, time i povećanje broja uspješnih sudara i posljedično ubrzanje reakcije prema Arrheniusovom zakonu. Ako se reakcija odvija u zatvorenoj posudi, iznimno brzo zagrijavanje će uz povećanje tlaka uzrokovati i povećanje vrelišta otapala, čak i do 190 °C većeg od vrelišta pri atmosferskom tlaku (npr. metanol) (Kappe i sur., 2012). Pri takvim će se uvjetima pregrijavanja reakcije odvijati značajno brže, pa će, poštujući Arrheniusov zakon, reakcija prvog reda koja pri 25 °C postiže konverziju od 90 % za 9 tjedana, a pri 100 °C (uz refluks) za 5 sati, pri temperaturi od 270 °C istu konverziju dostići za 1 sekundu (Kappe i sur., 2013). Teorijske pretpostavke približno potvrđuju i eksperimentalni podaci (Damm i sur., 2009).

Jedinstvenost dielektričnog mehanizma zagrijavanja kod MW uvjetuje pojavu specifičnih mikrovalnih učinaka, tj. termičkih učinaka koji se ne mogu reproducirati klasičnim metodama zagrijavanja. Među te se učinke ubrajaju: pregrijavanje tekućina pri atmosferskom tlaku, selektivno zagrijavanje heterogenih katalizatora ili reagensa, stvaranje *molekulskih radijatora*,

selektivno zagrijavanje u vižefaznim tekućim sustavima i eliminacija učinka stijenke (Kappe i sur., 2012).

Pregrijavanje znači povećanje temperature tekućina iznad ravnotežnog vrelišta pri atmosferskom tlaku (u otvorenoj posudi) bez vrenja, što za neka otapala može iznositi i 40 °C (Chemat i Esveld, 2001). Učinak se objašnjava različitim gradijentom temperature u odnosu na konvencionalno zagrijavanje. Kod klasičnog je zagrijavanju stijenka posude na višoj temperaturi od tekućine u njoj, što uzrokuje stvaranje pregrijanih slojeva tekućine uz stijenk, u blizini mikronskih šupljina i ogrebotina u stijenci koje su nukleacijska mjesta vrenja. Pregrijana tekućina u blizini takvih mjesta ispunjenih malom količinom plina omogućuje prevladavanje tlaka i površinske napetosti te rast balončića pare (Clark i sur., 1959). Kod MW se zagrijavanja stijenka konstantno hladi konvekcijom okolnog zraka i ona je hladnija od ostatka volumena dielektrično grijane tekućine. Takav profil zagrijavanja omogućuje stvaranje vanjskih slojeva tekućine temperature dovoljne za rast balončića tek pri uvjetima pregrijavanja cijele smjese (Baghurst i Mingos, 1992). Temperatura na kojoj će doći do vrenja prilikom MW zagrijavanja jako ovisi o eksperimentalnim uvjetima: snazi MW uređaja, geometriji, materijalu i stanju reaktora (posude), distribuciji električnog polja itd. Važno je naglasiti da se praktički sav učinak pregrijavanja može ukloniti dodatkom kamenčića za vrenje ili miješanjem (Chemat i Esveld, 2001). Budući da svi današnji MW uređaji imaju opciju miješanja i da se velika većina reakcija odvija u zatvorenim posudama, ovaj učinak nije od praktične važnosti u laboratorijskim uvjetima (Kappe i sur., 2012).

U praksi važniji specifični učinak jest selektivno zagrijavanje heterogenih reagensa ili katalizatora u manje polarnom reakcijskom mediju, koje dovodi do razlike u temperaturi između zagrijavane i nezagrijavane komponente od čak 100 °C. Iskorištavanjem tog fenomena u heterogenim sustavima plin-krutina postignuta je bolja selektivnost i veća brzina reakcija (Zhang i sur., 2003). Dobri su rezultati isprva postignuti i dielektričnim zagrijavanjem krutih, snažno apsorbirajućih katalizatora u manje polarnoj otopini: dvostruko povećana brzina hidrogenacije dvostrukih C=C veza uz Pd/C katalizator (Vanier, 2007), povećanje iskorištenja Suzukijeve reakcije uz kapsulirani paladij (Baxendale i sur., 2006), značajno ubrzanje sinteze Grignardovih reagensa uz strugotine magnezija (van de Krujis i sur., 2010). Međutim, daljnja su istraživanja pokazala da je zabilježena razlika u brzini potjecala od neučinkovitog miješanja (Irfan i sur., 2009) ili od lošeg mjerenja temperature u kontrolnom eksperimentu (Glasnov i sur., 2009). Jedino je navedena sinteza Grignardovih reagensa eksperimentalno potvrđena, a predložen je i mehanizam prema kojem učinak potječe

od čišćenja sloja magnezijevog oksida djelovanjem električnog polja (*electrostatic etching*) (van de Krujis i sur., 2010).

Još jedan specifični mikrovalni učinak koji se barem teoretski može pretpostaviti jest zagrijavanje cijele smjese djelovanjem na polarne sastavnice homogenog sustava tekuće-tekuće. Kako bi samo dio molekula smjese, tj. njihove polarne skupine sudjelovale u tome, takve se molekule nazivaju *molekulskim radiatorima* (Kaiser i sur., 2000). Međutim, postojanje takvih „vrućih“ specija je eksperimentalno teško dokazati jer se toplina gotovo trenutačno prenosi na okolne molekule (Kappe i sur., 2012).

Eksperimentalno iskoristiv učinak jest selektivno zagrijavanje jedne faze u dvofaznom tekućem sustavu. Za taj je učinak neophodna razlika u $\tan \delta$ među fazama (Kappe i sur., 2012). Primjer takvog učinka je rad Ranera i suradnika (1995) u kojem je termički nestabilan produkt Hoffmanove eliminacije koja se odvijala u vodenom sloju ($\tan \delta = 0,123$) ekstrahiran u hladniji kloroformski sloj ($\tan \delta = 0,091$). Temperatura vodenog sloja je bila 110 °C, a organskog 50 °C.

Posljednji opisani specifični mikrovalni učinak jest eliminacija učinka stijenke, tj. izostanak inaktivacije temperaturno osjetljivih specija poput katalizatora i posljedičnog usporavanja reakcije. Pretpostavke o postojanju ovog učinka nisu potvrđene studijom koja je koristila katalizatore temeljene na ruteniju i u kojoj su rezultati dobiveni MW zagrijavanjem uspješno ponovljeni korištenjem uljne kupelji (Dallinger i sur., 2010). Često pretpostavljenu mogućnost da vruće stijenke posude grijane u uljnoj kupelji mogu uzrokovati neželjene reakcije kod snažno miješanih smjesa niske viskoznosti također tek treba potvrditi usporedbom s dielektrično grijanim smjesama (Kappe i sur., 2012).

Uređaji za mikrovalnu sintezu

Pionirski pokusi MW sinteze sredinom 1980-ih provedeni su korištenjem mikrovalnih pećnica namijenjenih kućnoj upotrebi (Gedye i sur., 1986). Takve su pećnice ipak imale mnoge funkcionalne i sigurnosne probleme. Jedan od glavnih nedostataka primjene takvih kućanskih uređaja jest mala reproducibilnost pokusa zbog neravnomjernog zagrijavanja smjese. Uzrok je tome promjenljivost u snazi zračenja koja nastaje zbog pulsno načina rada (uključeno-isključeno) izvora zračenja, tj. magnetrona. Drugi funkcionalni nedostaci su nemogućnost mjerenja temperature i tlaka te nemogućnost miješanja reakcijske smjese. Osim toga,

nehomogenost EM polja kod takvih uređaja uzrokuje neravnomjerno zagrijavanje smjese, pa se javljaju vruće i hladne točke. Sa sigurnosnog aspekta, korištenje kućanskih pećnica predstavlja rizik jer zagrijavanje organskih otapala u otvorenoj posudi može dovesti do eksplozije uslijed stvaranja električnih lukova ili iskrenja prilikom paljenja ili gašenja magnetrona. Ako se reakcija odvija u zatvorenoj posudi, nedostatak sklopova za nadzor i regulaciju tlaka također može dovesti do snažnih eksplozija. U početku su neke od ovih problema znanstvenici pokušavali riješiti *uradi-sam* nadogradnjom pećnica dijelovima poput miješalica ili hladila za refluks (Slika 3), ali su time neki sigurnosni problemi ostali (neotpornost uređaja na eksploziju) ili su nastali (izlazak potencijalno štetnog MW zračenja) (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005; Kappe i sur. 2012).

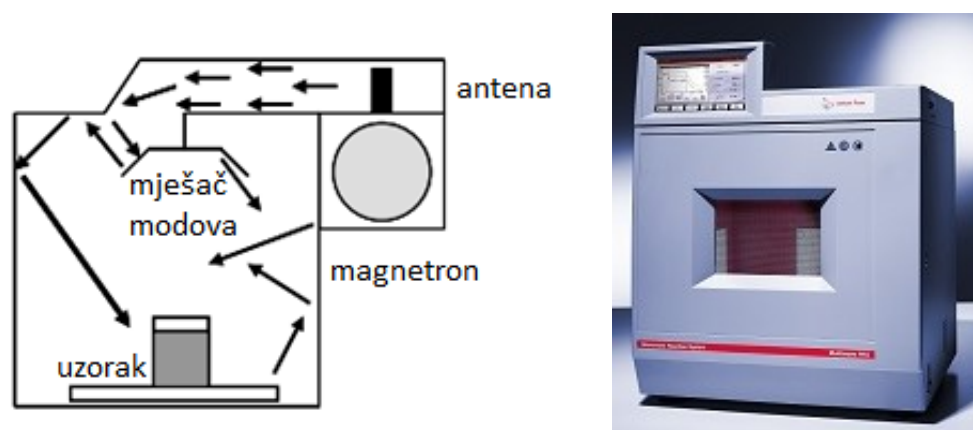


Slika 3. Kućanska mikrovalna pećnica modificirana za znanstvenu upotrebu. Na lijevoj strani su vidljivi otvori za IR termometar, na gornjoj je otvor za spajanje hladila, a ispod uređaja se nalazi magnetski mješač (Kappe i sur., 2012).

Svi danas komercijalno dostupni uređaji za MW sintezu imaju ugrađene uređaje za miješanje, uređaje za direktno mjerenje temperature reakcijske smjese putem IR senzora ili optičkih vlakana i softver potreban za kontrolu reakcijskih parametara reguliranjem snage zračenja. Prema osnovnim karakteristikama dizajna, moderni se MW reaktori dijele na multimodne i monomodne (Kappe i sur., 2012).

Multimodni uređaji prvi su se razvili iz kućanskih pećnica i zato su im konceptualno slični. Kod takvih uređaja jedan ili dva magnetrona stvaraju mikrovalno zračenje koje se putom

kratkog valovoda dovodi do mješača modova (*mode stirrer*) na kojem se distribuiraju u svim smjerovima, valovi zatim ulaze u tipično veliku šupljinu s uzorkom poput one u mikrovalnim pećnicama te se reflektiraju o unutarnje stijenke uređaja što dovodi do nasumične interakcije s uzorkom (Slika 4, lijevo). Zbog ovakve je distribucije mikrovalova ipak moguće stvaranje džepova s visokim i niskim intenzitetom zračenja, odnosno vrućih i hladnih točki, što se smanjuje postavljanjem uzorka na rotirajuće nosače. Veličina kućišta uređaja omogućuje postavljanje nosača za više posuda (do 96 reakcijskih posuda ili 4 mikrotitrarske pločice s po 48 jažica) i/ili za posude velikog volumena (do 1000 mL) što multimodne uređaje čini pogodnima za rad s velikim količinama uzorka i za *scale-up* (Kappe i sur., 2012).

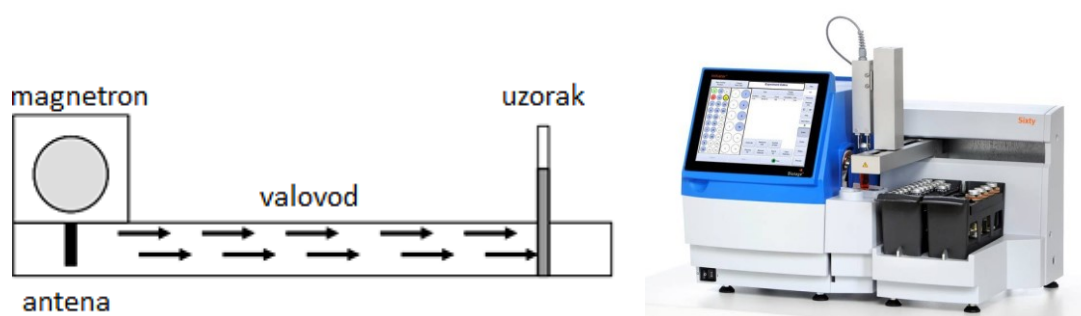


Slika 4. Shematski prikaz multimodnog MW reaktora (prilagođeno prema: Kappe i sur., 2012; <http://anton-paar.com/>) i fotografija jednog primjerka.

Glavni nedostaci multimodnih uređaja su niska gustoća EM polja, koja se, unatoč velikoj snazi magnetrona (do 1700 W), javlja zbog velike šupljine reaktora, te nehomogenost EM polja što za posljedicu ima manju reproducibilnost pokusa i teško zagrijavanje malih volumena uzoraka. Zbog toga je primjena ovakvih uređaja u istraživačkoj sintetskoj kemiji ograničena, a koristi se uglavnom za paralelne sinteze (Kappe i sur., 2012).

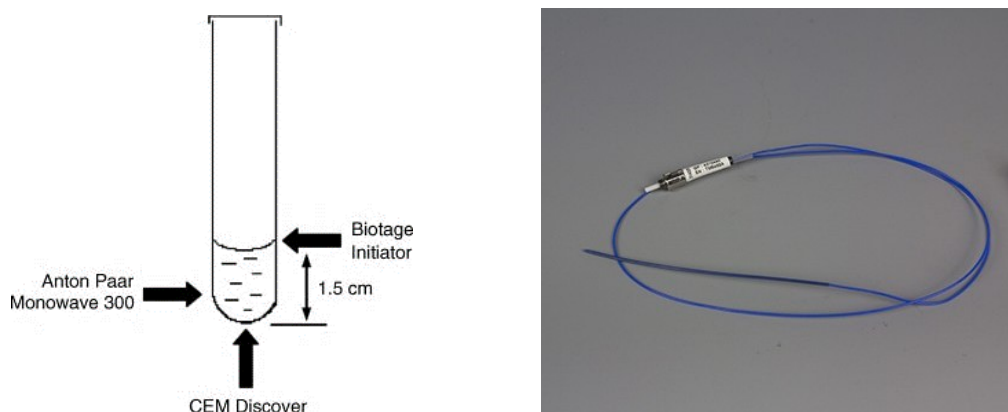
Monomodni uređaji razvijeni su tek kasnije, na prijelazu stoljeća, ali su od tada preuzeli primat na tržištu MW reaktora. Valovod takvih uređaj je drugačije konstruiran, dobro je definiran i uglavnom je pravokutnog presjeka, nema mješača modova, već se valovi direktno provode do uzorka koji se nalazi u točki najveće energije (Slika 5, lijevo). Monomodni dizajn omogućuje postizanje puno veće homogenosti polja, samim time i veće reproducibilnosti

pokusa i bržeg zagrijavanja malih uzoraka u odnosu na multimodne reaktore, čak i uz snage magnetrona od samo nekoliko stotina vata. Budući da u reaktor stane samo jedna zatvorena reakcijska posuda volumena do najviše 30 mL (u pravilu), zagrijavanje većeg broja uzoraka traje dulje i zahtjeva povećani angažman znanstvenika. Proizvođači su tomu doskočili dogradnjom *autosamplera* (Slika 5, desno) koji omogućuje automatizaciju procesa umetanja i vađenja reakcijskih posuda, čime se rasterećuje znanstvenike. Značajna prednost monomodnih reaktora je i ugrađeni sustav hlađenja strujom komprimiranog zraka koji može temperaturu smjese u kratkom vremenskom periodu (par minuta) spustiti s nekoliko stotina stupnjeva Celzija na temperaturu prikladnu za rukovanje (Kappe i sur., 2012).



Slika 5. Shematski prikaz monomodnog reaktora (prilagođeno prema: Kappe i sur., 2012) i fotografija jednog primjerka reaktora s *autosamplerom*.

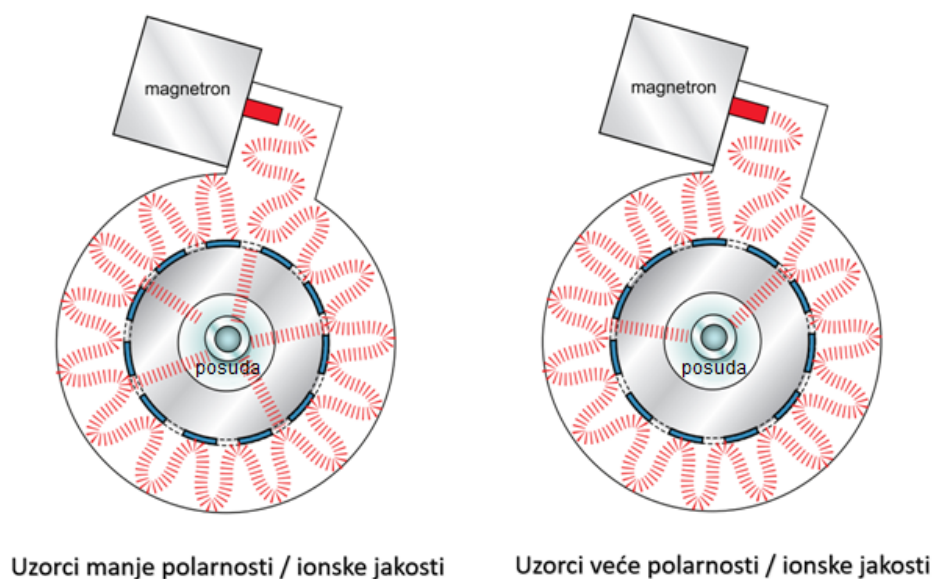
Bitan dio obje vrste reaktora koji uvelike utječe na reproducibilnost pokusa je uređaj za mjerenje temperature reakcijske smjese. Problem mjerenja temperature u MW reaktorima posljedica je činjenice da klasični termometri i metalni termoparovi ne funkcioniraju ispravno u MW uvjetima zbog sprezanja s EM poljem (Nüchter i sur., 2004). Zato se u većini reaktora temperatura mjeri IR senzorima koji izvana očitavaju temperaturu stijenke reakcijske posude. Međutim, kao što je već naglašeno, stijenka posude je kod MW zagrijavanja hladnija od smjese, stoga treba oprezno procjenjivati rezultate pokusa dobivene pri mjerenju temperature IR tehnikom. Dodatni problem kod usporedbe rezultata predstavlja činjenica da različiti proizvođači postavljaju IR senzore na različita mjesta u uređaju (Slika 6, lijevo), što može dovesti do diskrepancija u rezultatima kod rekreiranja pokusa u različitim reaktorima, pogotovo kod dvofaznih smjesa gdje postoji velika razlika u $\tan \delta$ među sastavnicama (Moseley i sur., 2007). Također, kod nekih je uređaja potreban minimalni volumen punjenja za ispravno mjerenje temperature (Slika 6, lijevo) (Kappe i sur., 2012).



Slika 6. Tehnike mjerenja temperature reakcijske smjese: pozicija IR senzora kod MW reaktora različitih proizvođača (Kappe i sur., 2012) i proba od optičkih vlakana (<http://cem.com/en/discover-fiber-optic-temperature-probe-297.html#>).

Točniji način mjerenja temperature je pomoću uranjajućih proba od optičkih vlakana (Slika 6, desno) s kristalom ili poluvodičem kao termoosjetljivim dijelom, koje su za razliku od klasičnih termoparova otporne na EM zračenje, ne provode struju i ne zahtijevaju kućište, a u usporedbi s IR senzorima su značajno preciznije i mjere pravu temperaturu smjese. Ipak, probe od optičkih vlakana imaju i svoje nedostatke. Osim puno veće cijene, senzorni kristal ili poluvodički termopar mora biti mehanički zaštićen premazom što uvelike smanjuje brzinu odgovora probe, ali produljuje njen vijek trajanja. Probe su uz to i termički osjetljive. Na temperaturama većim od 250°C, zbog neizbježnog korištenja polimera za lijepljenje optičkog vlakna s termoosjetljivim dijelom probe, brzo dolazi do njene razgradnje (Kappe i sur., 2012). Također, iako su probe uronjene u reakcijsku smjesu, potrebno je osigurati njeno učinkovito mješanje kako bi temperatura mjerena na položaju probe bila reprezentativna za cijelu smjesu (Herrero i sur., 2008).

Laboratorij Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta raspolaže monomodnim mikrovalnim reaktorom CEM Discover BenchMate. Jedinstvena karakteristika monomodnih raktora proizvođača CEM jest kružni valovod koji fokusira mikrovalno zračenje na reakcijsku posudu osiguravajući time homogeno i energetski gusto polje MW polje. Kućište se osim toga automatski prilagođava propuštajući do posude uvijek optimalnu količinu energije (Slika 7), ovisno o volumenu i apsorptivnim karakteristikama uzorka (Kappe i sur., 2012; Informativna brošura sustava CEM Discover).



Slika 7. Shematski prikaz samoregulirajućeg kružnog valovoda CEM Discover (SP) monomodnih reaktora (prilagođeno prema: informativna brošura sustava CEM Discover SP).

Uređaj može kontinuirano isporučivati najveću snagu od 300 W, što je dovoljno za brzo zagrijavanje većine smjesa. Temperatura se mjeri IR senzorom smještenim ispod posudice, pa je mjerenje temperature pouzdano i za male volumene uzorka (200 μ L za za reakcijske epruvete od 10 mL). Uređaj u Zavodu omogućuje rad sa zatvorenim epruvetama volumena do 10 mL ili s otvorenim tikvicama okruglog dna volumena do 125 mL. Reakcijske epruvete zatvaraju se praktičnim plastičnim čepovima (Slika 8, desno), a unutar reaktora se tlak ne mjeri zasebnim uređajem, već dizajn čepova omogućuje automatsko ventiliranje čim tlak unutar epruvete premaši vrijednost od 20 bara (Kappe i sur., 2012; Informativna brošura sustava CEM Discover).

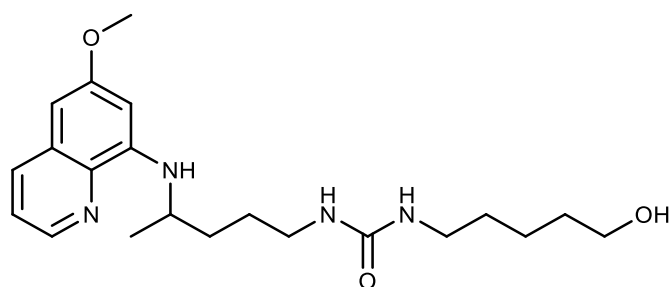


Slika 8. Uređaj za mikrovalnu sintezu u Zavodu za farmaceutsku kemiju i odgovarajući pribor

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj je ovoga rada sinteza i karakterizacija četiri do sada u literaturi neopisane uree primakina s aminoalkoholima koji u strukturi sadrže ciklopropan, ciklobutan, ciklopentan ili benzen.

Ciljni spojevi dizajnirani su temeljem pregleda literaturnih podataka i rezultata dosadašnjih istraživanja derivata primakina na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. U novijim radovima istraživačke skupine Zavoda za farmaceutsku kemiju sintetizirano je nekoliko serija derivata primakina s modifikacijama njegove terminalne primarne amino skupine. Mnogi od tih derivata pokazali su antiproliferativno djelovanje *in vitro* u niskim mikromolarnim koncentracijama na različitim tumorskim staničnim linijama (Šimunović i sur., 2009; Pavić i sur., 2014; Perković i sur., 2013; Džimbeg i sur., 2008; Perković i sur., 2016). Jedna od skupina spojeva koji su pokazali visoku djelotvornost je skupina urea primakina, od kojih je visoku selektivnost za humanu staničnu liniju adenokarcinoma debelog crijeva (SW 620) imao hidroksipentilni derivat (Šimunović i sur., 2009) prikazan na Slici 9.



Slika 9. Hidroksipentilna urea primakina

Budući da su i drugi derivati s hidroksi supstituentima povezanim na amino skupinu primakina preko poveznice bogate dušikom (amid, karbamat, *bis*-urea) imali snažna citostatska djelovanja (Džimbeg i sur., 2008; Perković i sur., 2016), u ovome je radu sintetizirana serija urea derivata primakina s aminoalkoholima.

Sintetizirani spojevi su karakterizirani uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (talište, IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR), a korištenjem računalnih programa predviđen je njihov farmakokinetički profil.

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvir ovog rada, tim spojevima bit će ispitano citostatsko i antimalarijsko djelovanje *in vitro*.

3. MATERIJALI I METODE

Tališta (t_R) su određena na Stuart SMP3 instrumentu za određivanje tališta (Barloworld Scientific, UK) u otvorenim kapilarama i nisu korigirana. CEM Discover mikrovalni reaktor (CEM Corporation, SAD) korišten je u mikrovalnoj sintezi ($P = 300$ W).

Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka), te cikloheksan/etil-acetat/metanol 3:1:0,5, diklormetan/metanol 95:5 i diklormetan/metanol 9:1 kao pokretne faze. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Sigma Aldrich, SAD), uz iste pokretne faze kao u TLC-u. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ($\lambda = 254$ nm) i parama joda.

IR spektri snimljeni su na Nicolet 6700 (Thermo Scientific, SAD) FT-IR spektrofotometru uz ATR komoru s dijamantnom kristalnom pločicom. ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-600 (Bruker, SAD) kod 300,13, odnosno 600,13 MHz za ^1H i kod 75,47, odnosno 150,90 MHz za ^{13}C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO- d_6 otopinama na 20 °C u NMR cijevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na signal tetrametilsilana (TMS) kao unutarnjeg standarda u ^1H , odnosno signal dimetilsulfoksida (DMSO) u ^{13}C spektru. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS instrumentu (Agilent Technologies Triple Quadropole 6420). Kao tehnika ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom modu.

Za predviđanje farmakokinetičkog profila korišteni su računalni programi Chemicalize (ChemAxon, SAD) i SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska).

Primakin difosfat, trifozgen, hidrazin hidrat, trietilamin (TEA) i natrijev ditionit nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD), a benzotriazol (BtH) je nabavljen od tvrtke Alfa Aesar (SAD). Aminoalkoholi (1-aminociklopropil)metanol, (1-aminociklobutil)metanol, (1*R*,3*S*)-3-aminociklopentan-1-ol hidroklorid i tiramin nabavljeni su od tvrtke Enamine (Ukrajina). Sve reakcije s primakinom izvođene su uz zaštitu od svjetlosti.

U eksperimentalnom dijelu korištena su bezvodna otapala. Bezvodni toluen dobiven je sljedećim postupkom: toluen je ekstrahiran vodom, osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destiliran i čuvan nad natrijem. Bezvodni dioksan dobiven je 24-satnim refluksiranjem na natriju. Destiliran je i čuvan nad natrijem. Bezvodni diklormetan dobiven je na sljedeći način: diklormetan je ekstrahiran vodom, sušen nad kalcijevim kloridom i predestiliran, te čuvan nad aktiviranim molekulskim sitima. Sve ostale kemikalije bile su *p.a.* čistoće.

Slobodna baza primakina pripremljena je otapanjem primakin difosfata u vodi, zaluzivanjem 5 %-tnom otopinom NaOH do pH 10–11 i ekstrakcijom diklormetanom. Organski sloj je uparen i korišten u daljnjim reakcijama.

3.1. Sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl) (1)

Klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **1** pripravljen je prema poznatom propisu (Kalčić i sur., 2003). Smjesa benzotriazola (0,596 g, 5 mmol) i trifozgena (0,991 g, 3,34 mmol) u bezvodnom toluenu refluksirana je 3 sata na 115 °C. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a dobiveni BtcCl **1** je bez čišćenja upotrijebljen u daljnjim reakcijama.

3.2. Sinteza benzotriazolida primakina (*N*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-karboksamid) (2)

Benzotriazolid primakina **2** sintetiziran je prema poznatom propisu (Džimbeg i sur., 2008). Otopini spoja **1** (0,904 g, 5 mmol) i TEA (0,696 mL, 5 mmol) u 15 mL bezvodnog toluena dokapana je otopina primakina (1,296 g, 5 mmol) u bezvodnom toluenu (15 mL) uz miješanje na ledenoj kupelji tijekom 15 minuta. Reakcijska smjesa je miješana 2 h na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti. Smjesa je potom ekstrahirana vodom (3 × 30 mL), a organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 3:1:0,5 i rastrljavanjem u eteru. IR spektar i talište benzotriazolida primakina **2** u potpunosti odgovaraju ranije sintetiziranom spoju.

3.3. Sinteza urea derivata primakina 3a-d

Opća metoda: Suspenziji 1 mmol odgovarajućeg aminoalkohola u suhom diklormetanu (2 mL) dodano je 0,139 mL (1 mmol) TEA uz miješanje do otapanja. Dobivenoj otopini dodano je 0,202 g spoja **2** (0,5 mmol) i nekoliko miligrama natrijevog ditionita. Ako je odgovarajući alkohol bio u obliku soli, dodana je dvostruka količina TEA (0,278 mL, 2 mmol). Reakcijska smjesa je grijana 30 minuta na 65 °C (*P* = 300 W) i zatim uparena pod sniženim tlakom.

3.3.1. Sinteza 3-[1-(hidroksimetil)ciklopropil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}uree (3a)

Količina reaktanta: 0,124 g (1 mmol) (1-aminociklopropil)metanol hidroklorida

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat 1:1,5. Dobiveno žuto ulje kristalizirano je iz smjese petroletera i acetona dajući žuti produkt **3a**.

Iskorištenje: 0,287 g (77 %)

t_r 140–141,5 °C

IR (ATR, ν / cm^{-1}): 3402, 3354, 3288, 3199, 3068, 2968, 2918, 2887, 1649, 1612, 1579, 1552, 1527, 1454, 1419, 1387, 1317, 1286, 1240, 1225, 1201, 1159, 1140, 1057, 1038, 1016, 968, 933, 908, 835, 822, 789, 771, 677, 629, 559, 457, 424.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm): 8,55–8,53 (dd, $J = 1,51, 4,14$ Hz, 1H), 8,09–8,06 (dd, $J = 1,42, 8,26$ Hz, 1H), 7,45–7,40 (m, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,26 (s, 1H), 6,18 (s, 1H), 6,13–6,10 (d, $J = 8,72$ Hz, 1H), 5,95–5,91 (t, $J = 5,50$ Hz, 1H), 4,88 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,62 (m, 1H), 3,34 (4", pokriven signalom H_2O), 3,0–2,98 (q, $J = 6,71, 12,21$ Hz, 1H), 1,62–1,43 (m, 4H), 1,22–1,20 (d, $J = 6,26$ Hz, 3H), 0,65–0,50 (m, 4H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm): 159,01, 158,63, 144,63, 144,26, 134,81, 134,53, 129,59, 122,12, 96,13, 91,62, 66,08, 54,99, 47,04, 39,02, 34,27, 33,48, 26,82, 20,21, 11,61.

ESI-MS m/z : 767,0 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 373,0 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 286,0 $[\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2]^+$.

3.3.2. Sinteza 3-[1-(hidroksimetil)ciklobutil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}uree (3b)

Količina reaktanta: 0,101 g (1 mmol) (1-aminociklobutil)metanola

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat 1:1, te zatim uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 3:1:0,5. Kristalizacijom iz smjese acetona i petroletera dobivena je blijedosiva krutina **3b**.

Iskorištenje: 0,352 g (91 %)

t_r 102–104,5 °C

IR (ATR, ν / cm^{-1}): 3348, 2939, 2854, 1643, 1612, 1560, 1516, 1454, 1421, 1385, 1336, 1290, 1259, 1221, 1198, 1169, 1155, 1134, 1113, 1041, 1030, 972, 933, 847, 820, 791, 752, 677, 619, 476, 444.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm): 8,55–8,53 (dd, $J = 1,56, 4,14$ Hz, 1H), 8,08–8,07 (dd, $J = 1,47, 8,26$ Hz, 1H), 7,43–7,41 (m, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,27 (s, 1H), 6,12–6,11 (d, $J = 8,71$ Hz, 1H), 5,90 (t, $J = 5,60$ Hz, 1H), 5,88 (s, 1H), 5,01–4,99 (t, $J = 5,38$ Hz, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,63–3,61 (m, 1H), 3,45–3,44 (d, $J = 5,38$ Hz, 2H), 2,99–2,97 (m, 1H), 2,10–2,09, 1,95–1,93, 1,75–1,73, 1,65–1,61, 1,53–1,43 (5m, 10H), 1,22–1,21 (d, $J = 6,29$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm): 158,99, 157,71, 144,63, 144,22, 134,76, 134,51, 129,55, 122,06, 96,10, 91,63, 66,16, 56,63, 54,95, 47,04, 39,02, 33,55, 29,54, 26,80, 20,21, 13,93.

ESI-MS m/z : 795,0 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 387,0 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 286,0 $[\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2]^+$.

3.3.3. Sinteza 3-[(1*S*,3*R*)-3-hidroksiciklopentil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}uree (3c)

Količina reaktanta: 0,138 g (1 mmol) (1*R*,3*S*)-3-aminociklopentanol hidroklorida

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,1, te zatim uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5 dajući žuto ulje **3c**.

Iskorištenje: 0,313 g (81 %)

IR (ATR, ν / cm^{-1}): 3340, 2943, 2927, 2854, 1705, 1614, 1554, 1516, 1452, 1421, 1385, 1282, 1254, 1219, 1196, 1155, 1082, 1049, 1028, 899, 820, 791, 675, 621, 526.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm): 8,54–8,53 (dd, $J = 1,56, 4,15$ Hz, 1H), 8,08–8,06 (dd, $J = 1,52, 8,23$ Hz, 1H), 7,43–7,41 (m, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,26 (s, 1H), 6,11–6,10 (d, $J = 8,71$ Hz, 1H), 5,85–5,83 (t, $J = 5,61$ Hz, 1H), 5,73–5,72 (d, $J = 8,15$ Hz, 1H), 4,60–4,59 (s, 1H), 4,05–4,04 (m, 1H), 3,86–3,82 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,63–3,60 (m, 1H), 2,98–2,97 (q, $J = 6,11, 12,19$ Hz, 2H), 2,01–1,96, 1,78–1,74, 1,63–1,59, 1,52–1,49, 1,43–1,42 (5m, 10H), 1,21–1,20 (d, $J = 6,32$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm): 158,99, 157,52, 144,61, 144,21, 134,76, 134,49, 129,55, 122,06, 96,08, 91,61, 70,50, 54,95, 49,24, 47,03, 42,5, 39,67, 33,53, 31,40, 26,88, 20,20.

ESI-MS m/z : 387,2 $[M + H]^+$, 286,1 $[C_{16}H_{20}N_3O_2]^+$.

3.3.4. Sinteza 3-[2-(4-hidroksifenil)etil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pencil}uree (3d)

Količina reaktanta: 0,137 g (1 mmol) 4-(2-aminoetil)fenola

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat 1:1, te zatim uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 3:1:0,75. Kristalizacijom iz smjese acetona i petroletera dobivena je žuta krutina **3d**.

Iskorištenje: 0,275 g (65 %)

t_r 75–77,5 °C

IR (ATR, ν / cm^{-1}): 3354, 2916, 2866, 1612, 1564, 1510, 1448, 1421, 1385, 1217, 1194, 1155, 1049, 1028, 966, 899, 816, 789, 673, 621, 507.

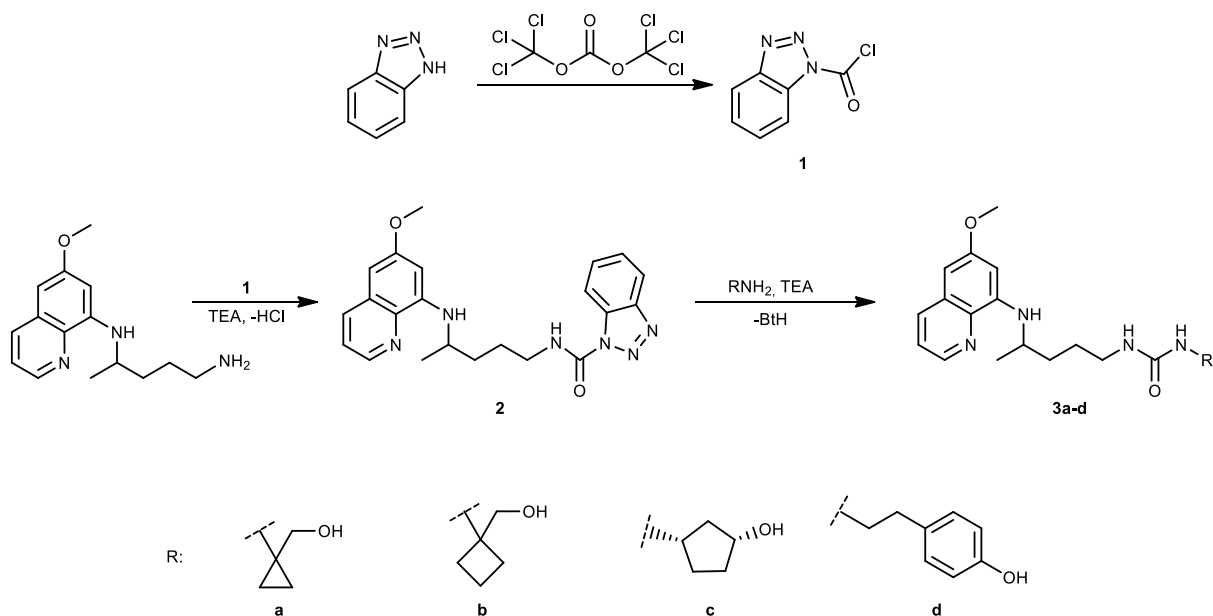
^1H NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm): 9,13 (s, 1H), 8,54–8,53 (dd, $J = 1,62, 4,17$ Hz, 1H), 8,08–8,06 (dd, $J = 1,56, 8,27$ Hz, 1H), 7,43–7,41 (m, 1H), 6,97–6,96 (d, $J = 8,42$ Hz, 2H), 6,68–6,66 (d, $J = 8,42$ Hz, 2H), 6,47 (s, 1H), 6,26 (s, 1H), 6,12–6,11 (d, $J = 8,73$ Hz, 1H), 5,88–5,86 (t, $J = 5,68$ Hz, 1H), 5,69–5,67 (t, $J = 5,67$ Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,62 (m, 1H), 3,14–3,12 (q, $J = 6,43, 13,95$ Hz, 2H), 3,00–2,99 (q, $J = 5,68, 11,83$ Hz, 2H), 2,54–2,52 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,62–1,44 (m, 4H), 1,21–1,20 (d, $J = 6,32$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm): 158,99, 157,94, 155,50, 144,62, 144,21, 134,76, 134,50, 129,74, 129,55, 129,40, 122,06, 115,03, 96,09, 91,62, 54,95, 47,04, 41,22, 39,02, 35,33, 33,52, 26,87, 20,21.

ESI-MS m/z : 423,0 $[M + H]^+$, 286,0 $[C_{16}H_{20}N_3O_2]^+$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je diplomskom radu opisana sinteza i karakterizacija četiri urea derivata primakina dosad neopisana u literaturi. Sintetizirani su derivati primakina i (1-aminociklopropil)metanola (**3a**), (1-aminociklobutil)metanola (**3b**), 3-aminociklopentanola (**3c**) i tiramina (**3d**) (Shema 7).



Shema 7. Sinteza urea derivata primakina **3a-d**.

Odabrani sintetski put uključuje prevođenje primakina u benzotriazolid primakina **2** pomoću klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **1**, potom reakciju s odgovarajućim aminoalkoholima, čime nastaju konačne uree **3a-d**.

Početni korak u sintezi bila je priprava klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **1** iz benzotriazola i trifozgena pri 115 °C u suhom toluenu (Kalčić i sur., 2003). Sintetizirani BtcCl **1** bez pročišćavanja je upotrijebljen u sljedećoj reakciji.

Primakin je komercijalno dostupan u obliku difosfatne soli, pa ga je potrebno neposredno prije reakcija prevesti u oblik slobodne baze. Vodena otopina primakin difosfata zalužena je 5 %-tnom otopinom NaOH do pH 10–11, a oslobođena baza primakina ekstrahirana je diklormetanom i uparena. Zbog fotolabilnosti primakina (Kristensen i sur., 1993), cijeli je postupak izveden uz zaštitu od svjetlosti.

Slobodna baza primakina i BtcCl **1** reagirali su uz TEA kao akceptor klorovodika u ledenoj kupelji dajući benzotriazolid primakina **2**. Sirovi produkt pročišćen je ekstrakcijom vodom, kromatografijom uparenog organskog sloja na koloni i rastrljavanjem u eteru, a talište i IR spektar dobivenog čistog produkta odgovarali su literaturi (Džimbeg i sur, 2008).

Sinteze ciljnih urea derivata **3a-d** provedene su reakcijama benzotriazolida primakina **2** i odgovarajućih aminoalkohola u suhom diklormetanu. TEA je kao baza u reakcijske smjese dodan u ekvimolarnoj količini u odnosu na aminoalkohol ili u dvostruko većoj količini ako je aminoalkohol bio u obliku soli, a natrij-ditionit je dodan kao antioksidans. Reakcijske smjese su 30 minuta zagrijavane u MW reaktoru uz konstantno miješanje. Otapalo je potom upareno, a sirovi produkt pročišćen kromatografijom na koloni s optimalnom pokretnom fazom i prekrystalizacijom iz smjese aceton/petroleter, ukoliko je to bilo moguće.

Tijek svih reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom. Nove uree **3a-d** karakterizirane su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (talište, IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS).

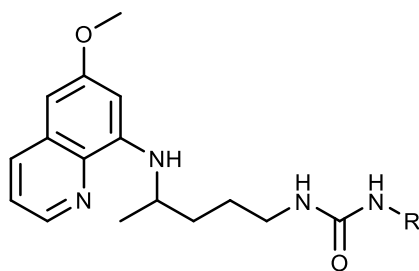
IR spektri urea primakina **3a-d** pokazuju karakteristične vrpce kod 3402–3348 (NH rastezanje), 1705–1641 (C=O rastezanje, amid I) i 1614–1527 (NH uvijanje, amid II) cm^{-1} .

^1H NMR spektri potvrđuju prisutnost primakinskog ostatka: signal vodikovog atoma susjednog dušiku kinolinskog prstena nalazi se na 8,55–8,53 kao dublet dubleta, singlet metoksi skupine je na 3,82–3,83, signal vodika vezanog na kiralni ugljikov atom vidljiv je kao multiplet na 3,63–3,60, a signal metilne skupine kao dublet na 1,22–1,20 ppm. Pripadajući ugljikovi atomi navedenih vodika vidljivi su u ^{13}C NMR spektru redom na: 144,26–144,21, 54,99–54,95, 47,04–47,03 i 20,21–20,20 ppm. U ^1H spektru vidljiv je i signal NH skupine vezane za kinolinski prsten na 6,13–6,10 ppm. Signali karbonilnih skupina uree vidljivi su u ^{13}C spektru na 158,63–157,52 ppm. Karboksilne skupine aminoalkoholnih dijelova derivata **3a** i **3c** vidljive su u ^1H spektru kao singleti na 4,88, odnosno 4,60–4,59, dok se kod derivata **3b** ta skupina javlja kao triplet na 5,01–4,99 ppm. Fenolna skupina tiraminskog dijela derivata **3d** javlja se kao singlet na 9,13 ppm.

U MS spektrima svih derivata **3a-d** vidljivi su pseudomolekulski ioni.

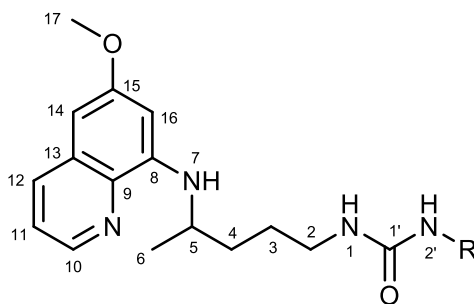
Analitički i spektroskopski podaci prikazani su u tablicama 3 i 4, a spektri u poglavlju Prilozi.

Tablica 3. Analitički i spektroskopski podaci urea primakina **3a-d**

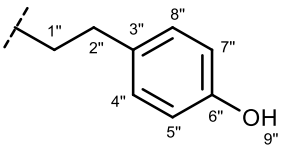


Spoj	R	t_r	Molekulska formula, M_r	MS (m/z)	IR (ATR) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$)
3a		140–141,5	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3$ 372,46	767,0 [2M + Na] ⁺ 373,0 [M + H] ⁺ 286,0 [C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₂] ⁺	3402, 3354, 3288, 3199, 3068, 2968, 2918, 2887, 1649, 1612, 1579, 1552, 1527, 1454, 1419, 1387, 1317, 1286, 1240, 1225, 1201, 1159, 1140, 1057, 1038, 1016, 968, 933, 908, 835, 822, 789, 771, 677, 629, 559, 457, 424
3b		102–104,5	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_3$ 386,49	795,0 [2M + Na] ⁺ 387,0 [M + H] ⁺ 286,0 [C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₂] ⁺	3348, 2939, 2854, 1643, 1612, 1560, 1516, 1454, 1421, 1385, 1336, 1290, 1259, 1221, 1198, 1169, 1155, 1134, 1113, 1041, 1030, 972, 933, 847, 820, 791, 752, 677, 619, 476, 444
3c		n.p.	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_3$ 386,49	387,2 [M + H] ⁺ 286,1 [C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₂] ⁺	3340, 2943, 2927, 2854, 1705, 1614, 1554, 1516, 1452, 1421, 1385, 1282, 1254, 1219, 1196, 1155, 1082, 1049, 1028, 899, 820, 791, 675, 621, 526
3d		75–77,5	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_3$ 422,52	423,0 [M + H] ⁺ 286,0 [C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₂] ⁺	3354, 2916, 2866, 1641, 1612, 1564, 1510, 1448, 1421, 1385, 1217, 1194, 1155, 1049, 1028, 966, 899, 816, 789, 673, 621, 507

Tablica 4. ^1H i ^{13}C NMR spektroskopski podaci urea primakina **3a-d**.



Spoj	R	^1H NMR (DMSO- d_6) (δ / ppm, J / Hz)	^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ / ppm, J / Hz)
3a		8,55–8,53 (dd, J = 1,51, 4,14, 1H, 10), 8,09–8,06 (dd, J = 1,42, 8,26, 1H, 12), 7,45–7,40 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,26 (s, 1H, 14), 6,18 (s, 1H, 2'), 6,13– 6,10 (d, J = 8,72, 1H, 7), 5,95–5,91 (t, J = 5,50, 1H, 1), 4,88 (s, 1H, 5''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,62 (m, 1H, 5), 3,34 (4'', pokriven signalom H ₂ O), 3,0–2,98 (q, J = 6,71, 12,21, 1H, 2), 1,62–1,43 (m, 4H, 3, 4), 1,22–1,20 (d, J = 6,26, 3H, 6), 0,65–0,50 (m, 4H, 2'', 3'')	159,01 (15), 158,63 (1'), 144,63 (8), 144,26 (10), 134,81 (12), 134,53 (9), 129,59 (13), 122,12 (11), 96,13 (16), 91,62 (14), 66,08 (4''), 54,99 (17), 47,04 (5), 39,02 (2), 34,27 (1''), 33,48 (4), 26,82 (3), 20,21 (6), 11,61 (2'', 3'')
3b		8,55–8,53 (dd, J = 1,56, 4,14, 1H, 10), 8,08–8,07 (dd, J = 1,47, 8,26, 1H, 12), 7,43–7,41 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,27 (s, 1H, 14), 6,12–6,11 (d, J = 8,71, 1H, 7), 5,90 (t, J = 5,60, 1H, 1), 5,88 (s, 1H, 2'), 5,01–4,99 (t, J = 5,38, 1H, 6''), 3,83 (s, 3H, 17), 3,63–3,61 (m, 1H, 5), 3,45–3,44 (d, J = 5,38, 2H, 5''), 2,99–2,97 (m, 1H, 2), 2,10–2,09, 1,95–1,93, 1,75– 1,73, 1,65–1,61, 1,53–1,43 (5m, 10H, 3, 4, 2''–4''), 1,22–1,21 (d, J = 6,29, 3H, 6)	158,99 (15), 157,71 (1'), 144,63 (8), 144,22 (10), 134,76 (12), 134,51 (9), 129,55 (13), 122,06 (11), 96,10 (16), 91,63 (14), 66,16 (5''), 56,63 (1''), 54,95 (17), 47,04 (5), 39,02 (2), 33,55 (4), 29,54 (2'', 4''), 26,80 (3), 20,21 (6), 13,93 (3'')
3c		8,54–8,53 (dd, J = 1,56, 4,15, 1H, 10), 8,08–8,06 (dd, J = 1,52, 8,23, 1H, 12), 7,43–7,41 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,26 (s, 1H, 14), 6,11–6,10 (d, J = 8,71, 1H, 7), 5,85–5,83 (t, J = 5,61, 1H, 1), 5,73–5,72 (d, J = 8,15, 1H, 2'), 4,60–4,59 (s, 1H, 6''), 4,05–4,04 (m, 1H, 1''), 3,86– 3,82 (m, 1H, 3''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,63– 3,60 (m, 1H, 5), 2,98–2,97 (q, J = 6,11, 12,19, 2H, 2), 2,01–1,96, 1,78–1,74, 1,63–1,59, 1,52–1,49, 1,43–1,42 (5m, 10H, 3, 4, 2'', 4'', 5''), 1,21–1,20 (d, J = 6,32, 3H, 6)	158,99 (15), 157,52 (1'), 144,61 (8), 144,21 (10), 134,76 (12), 134,49 (9), 129,55 (13), 122,06 (11), 96,08 (16), 91,61 (14), 70,50 (3''), 54,95 (17), 49,24 (1''), 47,03 (5), 42,41 (2''), 39,02 (2), 33,67 (4''), 33,53 (4), 31,40 (5''), 26,88 (3), 20,20 (6)

3d		9,13 (s, 1H, 9''), 8,54–8,53 (dd, J = 1,62, 4,17, 1H, 10), 8,08–8,06 (dd, J = 1,56, 8,27, 1H, 12), 7,43–7,41 (m, 1H, 11), 6,97–6,96 (d, J = 8,42, 2H, 4'', 8''), 6,68–6,66 (d, J = 8,42, 2H, 5'', 7''), 6,47 (s, 1H, 16), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12–6,11 (d, J = 8,73, 1H, 7), 5,88–5,86 (t, J = 5,68, 1H, 1), 5,69–5,67 (t, J = 5,67, 1H, 2'), 3,82 (s, 3H, 17), 3,62 (m, 1H, 5), 3,14–3,12 (q, J = 6,43, 13,95, 2H, 1''), 3,00–2,99 (q, J = 5,68, 11,83, 2H, 2), 2,54–2,52 (t, J = 7,2, 2H, 2''), 1,62–1,44 (m, 4H, 3, 4), 1,21–1,20 (d, J = 6,32, 3H, 6)	158,99 (15), 157,94 (1'), 155,50 (6''), 144,62 (8), 144,21 (10), 134,76 (12), 134,50 (9), 129,74 (3''), 129,55 (13), 129,40 (4'', 8''), 122,06 (11), 115,03 (5'', 7''), 96,09 (16), 91,62 (14), 54,95 (17), 47,04 (5), 41,22 (1''), 39,02 (2), 35,33 (2''), 33,52 (4), 26,87 (3), 20,21 (6)
----	---	--	---

Dva osnovna cilja prilikom dizajniranja potencijalne nove molekule lijeka su postizanje učinkovitosti i sigurnosti, a obje karakteristike ovise o farmakodinamskim i farmakokinetским svojstvima lijeka. Dok se farmakodinamska svojstva lijeka teže predviđaju jednostavnim kalkulacijama, pogotovo bez jasne kristalne strukture mete na koju bi lijek trebao djelovati, za predviđanje farmakokinetских svojstava razvila su se brojna pravila i računalni alati.

Bitno farmakokinetско svojstvo koje bi molekula lijeka trebala imati jest sposobnost apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta (GIT), odnosno razina oralne bioraspoloživosti. Najpoznatiji set pravila koji na temelju fizikalno-kemijskih svojstava predviđa hoće li molekula biti oralno bioraspoloživa jest „Lipinskijevo pravilo pet“. Ono je utemeljeno na sistematičnoj analizi molekula iz Svjetskog indeksa lijekova (WDI) i postavlja četiri pravila koja molekula mora zadovoljiti da bi bila oralno bioraspoloživa: relativna molekulska masa manja od 500, logaritam particijskog koeficijenta ($\log P$) ne veći od 5, sadrži ne više od pet donora i ne više od deset akceptora vodikovih veza (Lipinski i sur., 1997).

Druga poznata pravila objavili su 2002. godine Veber i suradnici, kritizirajući granice M_r i $\log P$ određene Lipinskijevim pravilima i predlažući nefleksibilnost molekule i malenu polarnost površine molekula kao glavne prediktore oralne bioraspoloživosti. Kao granica prihvatljive fleksibilnosti određen je broj rotirajućih veza od 10, a za malenu polarnost površine određeni su kriteriji zbroja donora i akceptora vodikovih veza ne veći od 12 ili ploštine zone polarne površine (PSA) manje od 140 Å² (Veber i sur., 2002).

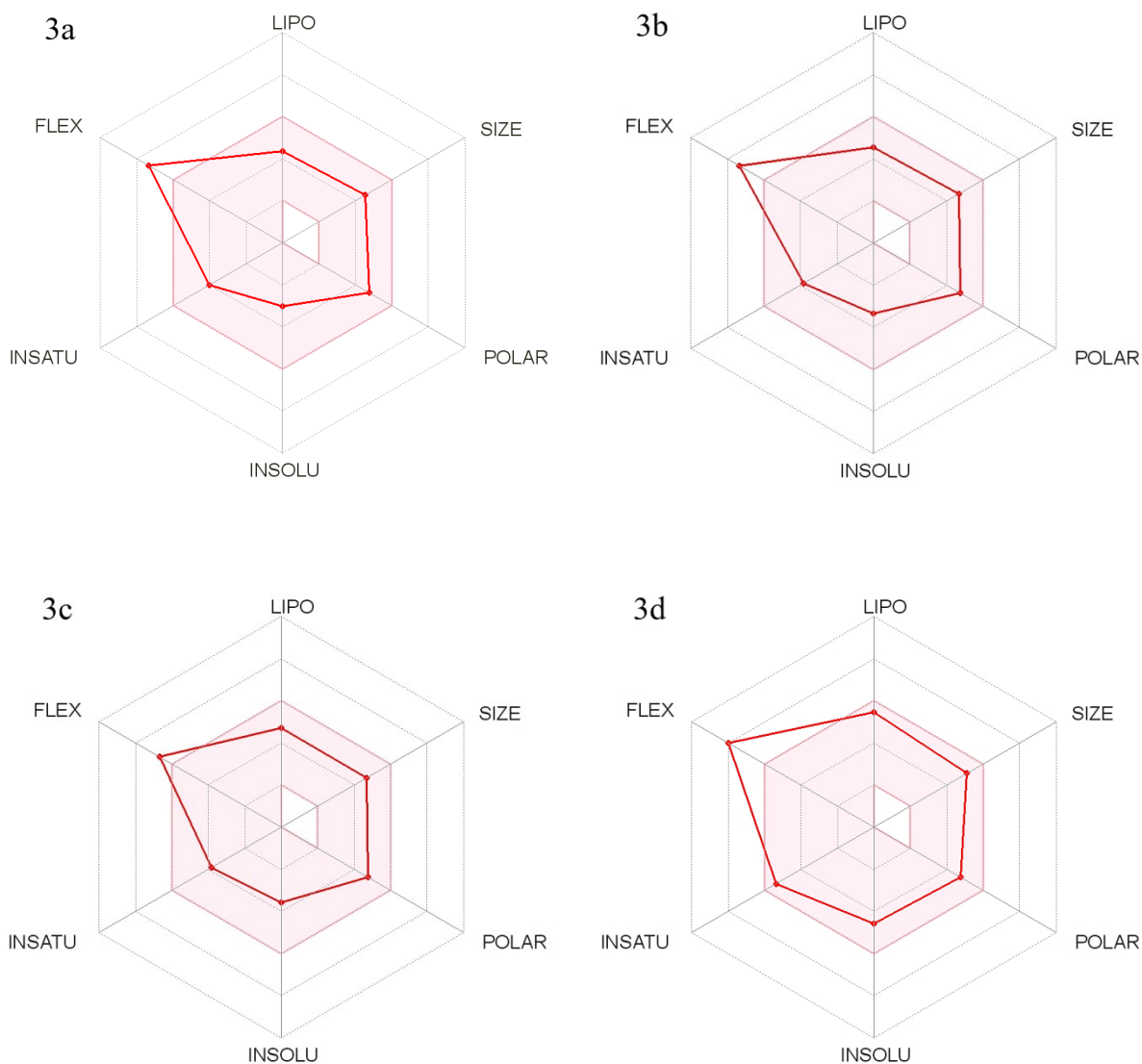
Tablica 5. Pregled Lipinskijevih i Veberovih parametara novih urea derivata primakina **3a-d** izračunatih korištenjem *web aplikacije* Chemicalize (<https://chemicalize.com/>)

Spoj	3a	3b	3c	3d
Molekulska formula	C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₃	C ₂₁ H ₃₀ N ₄ O ₃	C ₂₁ H ₃₀ N ₄ O ₃	C ₂₄ H ₃₀ N ₄ O ₃
<i>Mr</i>	372,469	386,496	386,496	422,529
log <i>P</i>	1,05	1,50	1,25	3,06
Broj donora vodikove veze	4	4	4	4
Broj akceptora vodikove veze	5	5	5	5
Zbroj donora i akceptora vodikove veze	9	9	9	9
Broj rotirajućih veza	9	9	8	10
TPSA ^a (Å ²)	95,51	95,51	95,51	95,51
Lipinskijeva pravila	4/4	4/4	4/4	4/4
Veberova pravila	3/3	3/3	3/3	3/3

^a topološka ploština zone polarne površine

Kao što je vidljivo iz podataka dobivenih *web aplikacijom* Chemicalize (<https://chemicalize.com/>; Tablica 5), sintetizirane uree imaju vrlo slične parametre koji bi mogli utjecati na apsorpciju iz GIT-a i sve zadovoljavaju i Lipinskijeva i Veberova pravila, stoga se prema tim jednostavnim pravilima može očekivati dobra oralna bioraspoloživost ovih molekula.

SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) besplatni je alat za izračun fizičko-kemijskih deskriptora molekula i predviđanje farmakokinetičkih parametara molekula (Daina i sur., 2017). Osim izračuna mnoštva parametara koji opisuju prikladnost molekule kao lijeka (*drug-likeness*), ovaj alat omogućuje i jedinstveni grafički prikaz parametara koji utječu na oralnu bioraspoloživost u obliku šesterokuta–*Bioavailability radar* (Slika 10).



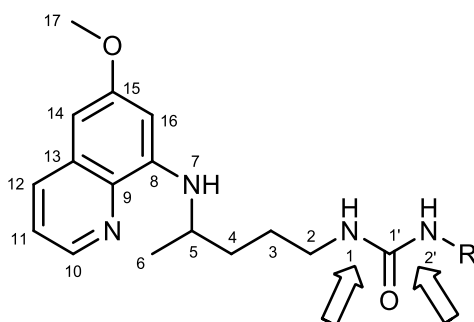
Slika 10. *Bioavailability radar* novih urea derivata primakina **3a-d**.

Svaki kut šesterokuta na Slici 10 predstavlja jedan parametar molekule (rastuće vrijednosti od središta šesterokuta prema kutovima) bitan za oralnu bioraspoloživost molekule-potencijalnog lijeka:

1. LIPO – lipofilnost kvantificirana vrijednošću logaritma partijskog koeficijenta izračunat korištenjem programa XLOGP 3.2.2. (*XLOGP3*);
2. SIZE – veličina molekule kvantificirana molekulskom masom;
3. POLAR – polarnost molekule kvantificirana vrijednošću *TPSA*;

4. INSOLU – netopljivost molekule kvantificirana negativnom vrijednošću logaritma molarne topljivosti izračunate topološkom metodom Delaneyja ($\log S$) (*ESOL*) (Delaney, 2004);
5. INSATU – nezasićenost veza kvantificirana udjelom sp^3 hibridiziranih ugljika u ukupnom broju atoma ugljika;
6. FLEX – fleksibilnost molekule kvantificirana brojem rotirajućih veza. Ružičasto polje označava optimalno područje vrijednosti veličina koje pozitivno koreliraju s oralnom bioraspoloživošću (Daina i sur., 2017).

Kao što je vidljivo na Slici 10, sva četiri derivata se po svim parametrima osim po parametru fleksibilnosti nalaze u optimalnom području. Prema ovom je alatu idealan broj rotirajućih veza manji od 9, a spojevi **3a-d** redom imaju po 11, 11, 10 i 12 rotirajućih veza. Iz istog razloga samo spoj **3c** zadovoljava Veberova pravila (broj rotirajućih veza ≤ 10). Usporedba s podacima iz tablice 5 ukazuje na to da Chemicalize i SwissADME različito računaju broj rotirajućih veza, pa su samim time i Veberova pravila drukčije vrednovana. O načinu brojanja rotirajućih veza u alatu SwissADME nema dostupnih podataka, pa se do objašnjenja ovakvih rezultata mora doći indukcijom. Na temelju usporedbe rezultata za primakin, za imaginarne bis-uree i druge spojeve s amidnim vezama, može se zaključiti da dvije dodatne rotirajuće veze (za sve spojeve) u odnosu na Chemicalize potječu od dvije C–N veze karbonilnog ugljika s dušicima 1 i 2' (Slika 11).



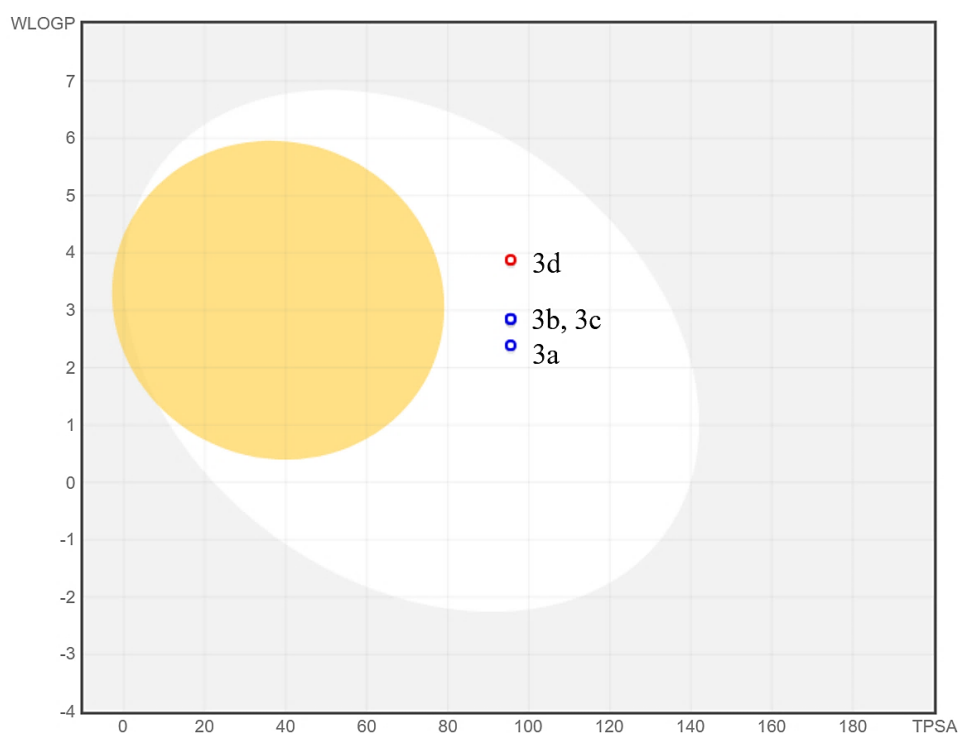
Slika 11. Položaj spornih veza obzirom na mogućnost rotacije u strukturi urea derivata primakina.

Originalni rad Vebera i sur. (2002) jasno definira rotirajuće veze kao: „sve jednostruke veze koje nisu dio prstena, a vezane su za neterminalni teški atom. Iz tog su brojanja isključene i

amidne C–N veze“. Kao što je pokazano, SwissADME među rotirajuće veze ubraja i amidne C–N veze što vodi do zaključka da način brojanja rotirajućih veza tog alata nije prikladan za procjenu sukladnosti Veberovim pravilima.

Ipak, prema vlastitim kriterijima SwissADME alata jasno je da bi u slučaju daljnje optimizacije spojeva za povećanje oralne bioraspoloživosti trebalo pristupiti ukrućivanju strukture.

Drugi jedinstveni grafički prikaz rezultata internog farmakokinetičkog modela *Brain Or Intestinal EstimateD permeation method (BOILED-Egg)* za sintetizirane urea derivate vidljiv je na Slici 12. Taj je model razvijen za procjenu permeabilnosti molekula kroz intestinalnu i krvno-moždanu barijeru (KMB), a temelji se na izračunu TPSA, WLOGP (logaritam particijskog koeficijenta izračunat prema metodi objavljenoj u radu Wildmana i Crippena iz 1999.) i procjeni hoće li molekula biti supstrat P-glikoproteina (P-gp) na temelju internog modela (Daina i Zoete, 2016).



Slika 12. Grafički prikaz rezultata *Boiled-Egg* modela za urea derivate **3a-d**.

Kružići koji se nalaze u bijelom području (*bjelanjku*) označavaju molekule za koje se predviđa dobra pasivna apsorpcija kroz gastrointestinalni trakt, a onima u žutom (*žutanjku*) se predviđa i pasivna permeacija kroz KMB. Plava boja kružića označava molekule kojima je predviđeno da su supstrati P-gp, a crvena one kojima nije (Daina i Zoete, 2016).

Slika 12 jasno pokazuje da je svim derivatima **3a-d** predviđena dobra pasivna apsorpcija u GIT-u i neprolaženje KMB. Nemogućnost prelaska KMB smanjuje vjerojatnost središnjih nuspojava potencijalnog lijeka, ali i onemogućuje oralnu ili intravensku primjenu lijeka za liječenje tumora središnjeg živčanog sustava, pa u tom slučaju preostaje jedino intratekalna primjena. P-gp je efluksni protein prisutan u membranama mnogih stanica, uključujući i stanice mnogih organa GIT-a, stanice KMB i tumorske stanice, stoga mogućnost da su derivati **3a-c** susprati P-gp može značiti smanjenu djelotvornost na tumorske stanice zbog njihovog izbacivanja u međustanični prostor (Gottesman i sur., 1996).

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu nastavljeno je istraživanje derivata primakina kao potencijalnih citostatika koje se posljednjih nekoliko godina provodi u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Opisana je sinteza benzotriazolskom metodom i karakterizacija četiri nove uree primakina koje do sada nisu opisane u literaturi:

- 3-[1-(hidroksimetil)ciklopropil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}urea (**3a**)
- 3-[1-(hidroksimetil)ciklobutil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}urea (**3b**)
- 3-[(1*S*,3*R*)-3-hidroksiciklopentil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}urea (**3c**)
- 3-[2-(4-hidroksifenil)etil]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}urea (**3d**).

Svim novosintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ¹H ¹³C NMR, MS), a krutim je produktima određena i temperatura tališta.

Novosintetizirane uree primakina zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, što predviđa njihovu dobru oralnu bioraspoloživost pasivnom apsorpcijom. SwissADME alat također predviđa dobru oralnu bioraspoloživost sva četiri spoja, ali i to da nijedan od spojeva neće prelaziti KMB, što ograničava njihovu potencijalnu primjenu za liječenje tumora središnjeg živčanog sustava. Svim je spojevima, osim spoju **3d**, predviđeno da su supstrati P-gp, što može umanjiti njihovo antitumorsko djelovanje zbog efluksa iz tumorske stanice.

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvir ovog rada, novosintetiziranim derivatima bit će ispitano citostatsko i antimalarijsko djelovanje.

6. LITERATURA

Anton Paar Multiwave PRO, <https://www.anton-paar.com/corpen/products/details/microwave-reaction-system-multiwave-pro/>, pristupljeno 24.5.2018.

Baghurst DR, Mingos DMP. Superheating effects associated with microwave dielectric heating. *J Chem Soc Chem Comm*, 1992, 9, 674-677.

Bajaj K, Panda SS, El-Nachef C, Katritzky AR. Syntheses of chiral N-(protected) tri- and tetrapeptide conjugates. *Chem Biol Drug Des*, 2012, 80, 17-26.

Baxendale IR, Griffiths-Jones CM, Ley SV, Tranmer GK. Microwave-assisted Suzuki coupling reactions with an encapsulated palladium catalyst for batch and continuous-flow transformations. *Chem-Eur J*, 2006, 12, 4407-4416.

Benzotriazole-1,2,3 Material safety data sheet, <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923061>, 2013., pristupljeno 12.5.2018.

Berlan J, Giboreau P, Lefeuvre S, Marchand C. Organic-synthesis in microwave field-1st example of specific activation under homogeneous conditions. *Tetrahedron Lett*, 1992, 32, 2363-2366.

Bogdal D, Prociak A. Microwave-enhanced polymer chemistry and technology. Ames, Blackwell Publishing Professional, 2007, str. 4.

Butula I, Proštenik MV, Vela V. Reactions with 1-benzotriazolecarboxylic acid chloride. I. Synthesis of the 2,6-bis(hydroxymethyl)pyridinedicarbamates. *Croat Chem Acta*, 1977, 49, 837-842.

Butula I, Jadrijević-Mladar Takač M. Reactions with 1-benzotriazolecarboxylic acid chloride. VIII. Synthesis of N-hydroxyisocyanate derivatives. *Croat Chem Acta*, 2000, 73, 569-574.

Butula I, Vela V, Ivezić B. Reactions with N-benzotriazolecarbonyl chloride. IV. Synthesis of urea, semicarbazide and carbazide derivatives. *Croat Chem Acta*, 1978, 51, 339-346.

Butula I, Vela V, Zorc B. Reaktionen mit 1-Benzotriazolcarbonsaurechlorid. VI. 1 Synthese von 3, 1-Benzoxazin-4-onen bzw. Quinazolin-2, 4-(1H, 3H)-dionen. *Croat Chem Acta*, 1981, 54, 105-108.

Butula I, Zorc B. Čudesna molekula benzotriazol. *Kem Ind*, 2007, 56, 123-134.f

Butula I, Zorc B, Ljubić M, Karlović G. Reaktionen mit N-(1-Benzotriazolylcarbonyl)-aminosäuren; II. Eine neue Synthese von Aminosäure-amiden, Di-und Tripeptiden. *Synthesis*, 1983, 1983, 327-329.

CEM Discover SP-informativna brošura, http://cem.com/media/contenttype/media/literature/525_Broch_DiscSP_B087_English.pdf, pristupljeno 3.9.2018.

CEM Fiber Optic temperature probe, <http://cem.com/en/discover-fiber-optic-temperature-probe-297.html#>, pristupljeno 8.6.2018.

Chemat F, Esveld E. Microwave super-heated boiling of organic liquids: Origin, effect and application. *Chem Eng Technol*, 2001, 24, 735-744.

Chemicalize, <https://chemicalize.com/#/calculation>, pristupljeno 2.8.2018.

Clark H, Streng PS, Westwater JW. Active sites for nucleate boiling. *Chem Eng Progr*, 1959, 55, 103-110.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep-UK*, 2017, 7, 42717.

Daina A, Zoete V. A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *Chem Med Chem*, 2016, 11, 1117-1121.

Dallinger D, Irfan M, Suljanovic A, Kappe CO. An investigation of wall effects in microwave-assisted ring-closing metathesis and cyclotrimerization reactions. *J Org Chem*, 2010, 75, 5278-5288.

De la Hoz A, Diaz-Ortiz A, Moreno A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem Soc Rev*, 2005, 34, 164-178.

Delaney JS. ESOL: Estimating aqueous solubility directly from molecular structure. *J Chem Inf Comp Sci*, 2004, 44, 1000-1005.

Damm M, Glasnov TN, Kappe CO. Translating high-temperature microwave chemistry to scalable continuous flow processes. *Org Process Res Dev*, 2009, 14, 215-224.

Driowya M, Saber A, Marzag H, Demange L, Benhida R, Bourgin K. Microwave-assisted synthesis of bioactive six-membered heterocycles and their fused analogues. *Molecules*, 2016, 21, 492.

Džimbeg G, Zorc B, Kralj M, Ester K, Pavelić K, Balzarini J, De Clercq E, Mintas M. The novel primaquine derivatives of N-alkyl, cycloalkyl or aryl urea: synthesis, cytostatic and antiviral activity evaluations. *Eur J Med Chem*, 2008, 43, 1180-1187.

Gabriel C, Gabriel S, Grant EH, Halstead BSJ, Mingos DMP. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chem Soc Rev*, 1998, 27, 213-223.

Gedye R, Smith F, Westaway K, Ali H, Baldisera L, Laberge L, Rousell J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett*, 1986, 279-282.

Glasnov TN, Findening S, Kappe CO. Heterogeneous versus homogeneous palladium catalysts for ligandless mizoroki–heck reactions: A comparison of batch/microwave and continuous-flow processing. *Chem-Eur J*, 2009, 15, 1001-1010.

Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6, 610-617.

Hall CD, Panda SS. The benzotriazole story. U: Advances in heterocyclic chemistry: heterocyclic chemistry in the 21st century: A tribute to Alan Katritzky. Ramsden CA, Scriven EFV, urednici, Cambridge, Academic Press, 2016, str. 1-23.

Hayes BL. Microwave Synthesis: Chemistry at the speed of light. CEM Publishing, Matthews, 2002, str. 35.

Herrero MA, Kremsner JM, Kappe CO. Nonthermal microwave effects revisited: on the importance of internal temperature monitoring and agitation in microwave chemistry. *J Org Chem*, 2008, 73, 36-47.

Ibrahim MA, Panda SS, Birs AS, Serrano JC, Gonzalez CF, Alamry KA, Katritzky AR. Synthesis and antibacterial evaluation of amino acid–antibiotic conjugates. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24, 1856-1861.

Irfan M, Fuchs M, Glasnov TN, Kappe CO. Microwave-assisted cross-coupling and hydrogenation chemistry by using heterogeneous transition-metal catalysts: an evaluation of the role of selective catalyst heating. *Chem-Eur J*, 2009, 15, 11608-11618.

Jacob J, Chia LHL, Boey FYC. Thermal and non-thermal interaction of microwave radiation with materials. *J Mater Sci*, 1995, 30, 5321-5327.

Kaiser NFK, Bremberg U, Larhed M, Moberg C, Halberg A. Fast, convenient, and efficient molybdenum-catalyzed asymmetric allylic alkylation under noninert conditions: an example of microwave-promoted fast chemistry. *Angew Chem Int Ed*, 2000, 39, 3595-3598.

Kalčić I, Zovko M, Jadrijević-Mladar Takač M, Zorc B, Butula I. Synthesis and reactions of some azolecarboxylic acid derivatives. *Croat Chem Acta*, 2003, 76, 217-228.

Kappe CO, Pieber B, Dallinger D. Microwave effects in organic synthesis: myth or reality?. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52, 1088-1094.

Kappe CO, Stadler A, Dallinger D. Microwaves in organic and medicinal chemistry, second edition. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, str. 1-82.

Katritzky AR. Adventures with benzotriazole, predavanje, 2002.

Katritzky AR. The continuing magic of benzotriazole: An overview of some recent advances in synthetic methodology. *J Heterocyclic Chem*, 1999, 36, 1501-1522.

Katritzky AR, Cai C, Singh SK. Efficient microwave access to polysubstituted amidines from imidoylbenzotriazoles. *J Org Chem*, 2006, 71, 3375-3380.

Katritzky AR, He HY, Suzuki K. N-Acylbenzotriazoles: Neutral acylating reagents for the preparation of primary, secondary, and tertiary amides. *J Org Chem*, 2002, 65, 8210-8213.

Katritzky AR, Ignatchenko AV, Heungyuan L. Lithiation of N-substituted benzotriazoles. *Heterocycles*, 1995, 41, 131-146.

Katritzky AR, Lan X, Fan WQ. Benzotriazole as a synthetic auxiliary: benzotriazolylalkylations and benzotriazole-mediated heteroalkylation. *Synthesis*, 1994, 1994, 445-466.

Katritzky AR, Lan X, Lam JN. Benzotriazole mediated synthesis of methylenebisanielines. *Synthesis*, 1990, 1990, 341-346.

Katritzky AR, Lan X, Yang JZ, Denisko OV. Properties and synthetic utility of N-substituted benzotriazoles. *Chem Rev*, 1998, 98, 409-548.

Katritzky AR, Manju K, Singh SK, Meher NK. Benzotriazole mediated amino-, amido-, alkoxy- and alkylthio-alkylation. *Tetrahedron*, 2005, 61, 2555-2581.

Katritzky AR, Rachwal S. Synthesis of heterocycles mediated by benzotriazole. 1. Monocyclic systems. *Chem Rev*, 2009, 110, 1564-1610.

Katritzky AR, Rachwal S. Synthesis of heterocycles mediated by benzotriazole. 1. Bicyclic systems. *Chem Rev*, 2011, 111, 7063-7120.

Katritzky AR, Rachwal S, Hitchings GJ. Benzotriazole: a novel synthetic auxiliary. *Tetrahedron*, 1991, 47, 2683-2732.

Katritzky AR, Suzuki K, Wang Z. Acylbenzotriazoles as advantageous N-, C-, S-, and O-acylating agents. *Synlett*, 2005, 11, 1656-1665.

Katritzky AR, Wang Z, Tsikolia M, Hall CD, Carman M. Benzotriazole is thermally more stable than 1,2,3-triazole. *Tetrahedron Lett*, 2006, 47, 7653-7654.

Katritzky AR, Wang Z, Wang M, Wilkerson CR, Hall CD, Akhmedov NG. Preparation of β -keto esters and β -diketones by C-acylation/deacetylation of acetoacetic esters and acetyl ketones with 1-acylbenzotriazoles. *J Org Chem*, 2004, 69, 6617-6622.

Kristensen S, Grislingaas AL, Greenhill JV, Skjetne T, Karlsen J, Tønnesen HH. Photochemical stability of biologically active compounds: V. Photochemical degradation of primaquine in an aqueous medium. *Int J Pharm*, 1993, 100, 15-23.

Langa F, de la Cruz P, de la Hoz A, Diaz-Ortiz A, Diez-Barra E. Microwave irradiation: more than just a method for accelerating reactions. *Contemp Org Synth*, 1997, 4, 373-386.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev*, 1997, 23, 3-25.

Matijević-Sosa J, Zorc B, Butula I. Reaktionen mit N-(1-Benzotriazolylcarbonyl)-amino-säuren. III Synthese von Aminosäure-estern. *Croat Chem Acta*, 1985, 58, 239-243.

Matsukura T, Tanaka H. Applicability of zinc complex of L-carnosine for medical use. *Biochemistry-Moscow*, 2000, 65, 817-823.

Microwave, <https://en.wikipedia.org/wiki/Microwave>, pristupljeno 25.6.2018.

Mingos DMP, Baghurst DR. Tilden Lecture. Applications of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry. *Chem Soc Rev*, 1991, 20, 1-47.

Moseley JD, Lenden P, Thomson AD, Gilday JP. The importance of agitation and fill volume in small scale scientific microwave reactors. *Tetrahedron Lett*, 2007, 48, 6084-6087.

Muskolaj I, Matijević-Sosa J, Zorc B, Butula I. Reactions with N-(1-benzotriazolylcarbonyl)-aminoacid. V. Reactions with hydroxylamine. *Acta Pharmaceut*, 1997, 47, 109-115.

Nüchter M, Ondruschka B, Bonrath W, Gum A. Microwave assisted synthesis—a critical technology overview. *Green Chem*, 2004, 6, 128-141.

Opačić N, Barbarić M, Zorc B, Cetina M, Nagl A, Frković D, Kralj M, Pavelić K, Balzarini J, Andrei G, Snoeck R, De Clercq E, Raić-Malić S, Mintas M. The novel L- and D-amino acid derivatives of hydroxyurea and hydantoins: synthesis, X-ray crystal structure study, and cytostatic and antiviral activity evaluations. *J Med Chem*, 2005, 48, 475-482.

Pavić K. Sinteza, karakterizacija i biološko djelovanje semikarbazida, urea i ureidoamida primakina. Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017.

Pavić K, Perković I, Cindrić M, Pranjić M, Martin-Kleiner I, Kralj M, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Katsori AM, Zorc B. Novel semicarbazides and ureas of primaquine with bulky aryl or hydroxyalkyl substituents: Synthesis, cytostatic and antioxidative activity. *Eur J Med Chem*, 2014, 86, 502-514.

Pavić K, Perković I, Gilja P, Kozlina F, Ester K, Kralj M, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E, Zorc B. Design, synthesis and biological evaluation of novel primaquine-cinnamic acid conjugates of the amide and acylsemicarbazide type. *Molecules*, 2016, 21, 1629-1653.

Pavić K, Perković I, Pospíšilová S, Machado M, Fontinha D, Prudêncio M, Jampilek J, Coffey A, Endersen L, Rimac H, Zorc B. Primaquine hybrids as promising antimycobacterial and antimalarial agents. *Eur J Med Chem*, 2018, 143, 769-779.

Perković I, Pavić K, Ester K, Kralj M, Marijanović I, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E, Zorc B. Novel urea and semicarbazide primaquine derivatives with hydroxyphenyl and halogenphenyl substituents as potential antitumor agents, *Eur J Med Chem*, 2016, 88, 622-636.

Perković I, Tršinar S, Žanetić J, Kralj M, Martin-Kleiner I, Balzarini J, Hadjipavlou-Litina D, Katsori AM, Zorc B. Novel 1-acyl-4-substituted semicarbazide derivatives of primaquine—synthesis, cytostatic, antiviral and antioxidative studies. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2013, 28, 601-610.

Rajić Z, Kos G, Zorc B, Singh PP, Singh S. Macromolecular prodrugs. XII. Primaquine conjugates: synthesis and preliminary antimalarial evaluation. *Acta Pharmaceut*, 2009, 59, 107-115.

Rajić Z, Zovko Končić M, Miloloža K, Perković I, Butula I, Bucar F, Zorc B. Dvojni lijekovi primakina i nesteroidnih protuupalnih lijekova: Sinteza, hvatanje slobodnih radikala, antioksidativno djelovanje i keliranje Fe^{2+} iona. *Acta Pharmaceut*, 2010, 60, 325-337.

Rajić Z, Zorc B, Raić-Malić S, Ester K, Kralj M, Pavelić K, Balzarini J, De Clercq E, Mintas M. Hydantoin derivatives of L-and D-amino acids: synthesis and evaluation of their antiviral and antitumoral activity. *Molecules*, 2006, 11, 837-848.

Raner KD, Strauss CR, Trainor RW, Thorn JS. A new microwave reactor for batchwise organic synthesis. *J Org Chem*, 1995, 60, 2456-2460.

Salvo F, Fourrier-Réglat A, Bazin F, Robinson P, Riera-Guardia N, Haag M, Caputi AP, Moore N, Sturkenboom MC, Pariente A. Cardiovascular and gastrointestinal safety of NSAIDs: A systematic review of meta-analyses of randomized clinical trials. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89, 855-866.

Schanche JS. Microwave synthesis solutions from personal chemistry. *Mol Divers*, 2003, 7, 291-298.

Schmink JR, Leadbeater NE. Microwave heating as a tool for sustainable chemistry. An introduction. U: Microwave heating as a tool for sustainable chemistry. Leadbeater NE, urednik, Boca Raton, CRC Press, 2011, str. 1-24.

SwissADME, <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 2.8.2018.

Šimunović M, Perković I, Zorc B, Ester K, Kralj M, Hadjipavlou_Litina D, Pontiki E. Urea and carbamate derivatives of primaquine: Synthesis, cytostatic and antioxidant activities., *Bioorg Med Chem*, 2009, 17, 5605-5613.

Tiwari AD, Panda SS, Girgis AS, Sahu S, George RF, Srour AM, La Straza B, Asiri AM, Hall CD, Katritzky AR. Microwave assisted synthesis and QSAR study of novel NSAID acetaminophen conjugates with amino acid linkers. *Org Biomol Chem*, 2014, 12, 7238-7249.

Van de Krujis BHP, Dressen MH, Meuldijk J, Vekemans JA, Hulshof LA. Microwave-induced electrostatic etching: Generation of highly reactive magnesium for application in Grignard reagent formation. *Org Biomol Chem*, 2010, 8, 1688-1694.

Vanier GS. Simple and efficient microwave-assisted hydrogenation reactions at moderate temperature and pressure. *Synlett*, 2007, 2007, 131-135.

Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615-2623.

Wildman SA, Crippen GM. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. *J Chem Inf Comp Sci*, 1999, 39, 868-837.

Zhang X, Hayward DO, Mingos DMP. Effects of microwave dielectric heating on heterogeneous catalysis. *Catal Lett*, 2003, 88, 33-38.

Zorc B, Karlović G, Butula I. Reactions with N-(1-benzotriazolylcarbonyl)-amino acids. IV. The use of N-(1-benzotriazolylcarbonyl)-amino acid derivatives in peptide synthesis. *Croat Chem Acta*, 1990, 63, 565-578.

Zorc B, Rajić Džolić Z, Butula I. Benzotriazole as a synthetic auxiliary. *Croat Chem Acta*, 2012, 85, 595-602.

Zovko M, Kalčić I, Zorc B, Butula I. IR spectroscopy study of the amidation reaction of N-(1-Azolecarbonyl)amino acids on L-phenylalanine derivative models. *Croat Chem Acta*, 2003, 76, 229-233.

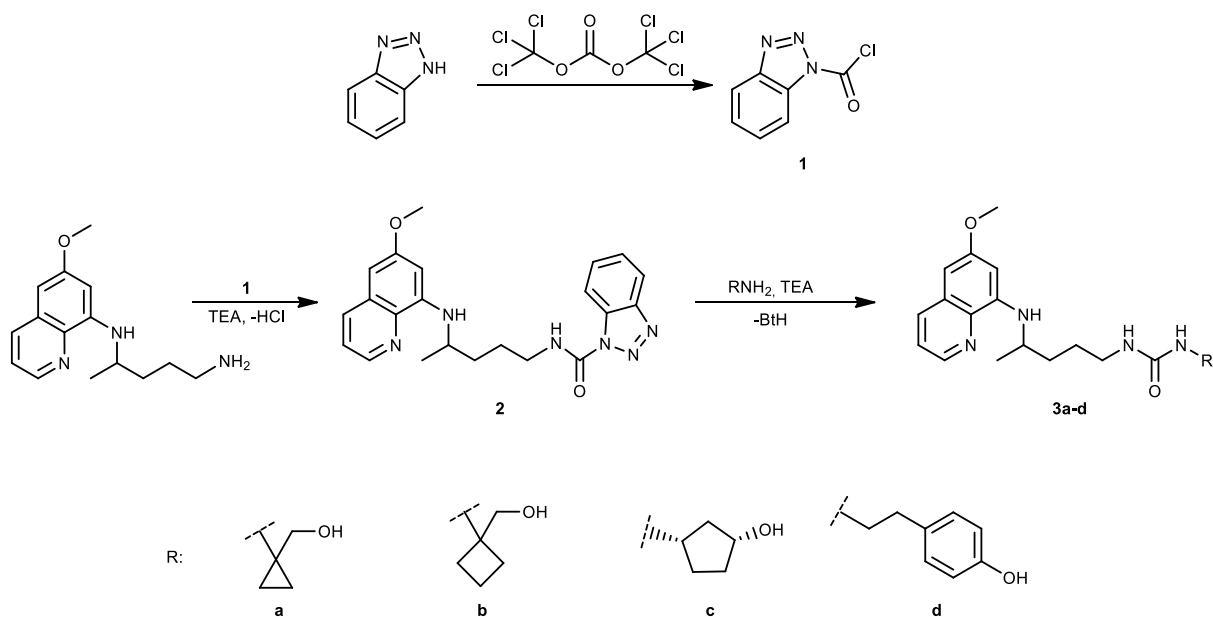
Zrinski I, Eckert-Maksić M, Primjena mikrovalnog zračenja u organskoj sintezi. *Kem Ind*, 2005, 54, 469-476.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Sinteza i karakterizacija novih urea primakina s aminoalkoholima

Ovaj rad nastavak je višegodišnjih istraživanja derivata primakina kao antiproliferativnih lijekova u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Temeljem rezultata tih istraživanja dizajnirane su kao potencijalni citostatici i antimalarici nove uree primakina koje u strukturi sadrže ciklički alifatski aminoalkohol ili fenol.

U okviru ovog rada sintetizirana su benzotriazolskom metodom četiri nove uree primakina s aminoalkoholima **3a-d**. Svim novosintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ^1H ^{13}C NMR, MS), a krutim je produktima određena i temperatura tališta.



Sva četiri spoja zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, a dobru oralnu bioraspoloživost predviđa im i alat SwissADME. Isti alat predviđa da su spojevi **3a-c** supstrati P-glikoproteina, što može umanjiti njihov antitumorski učinak.

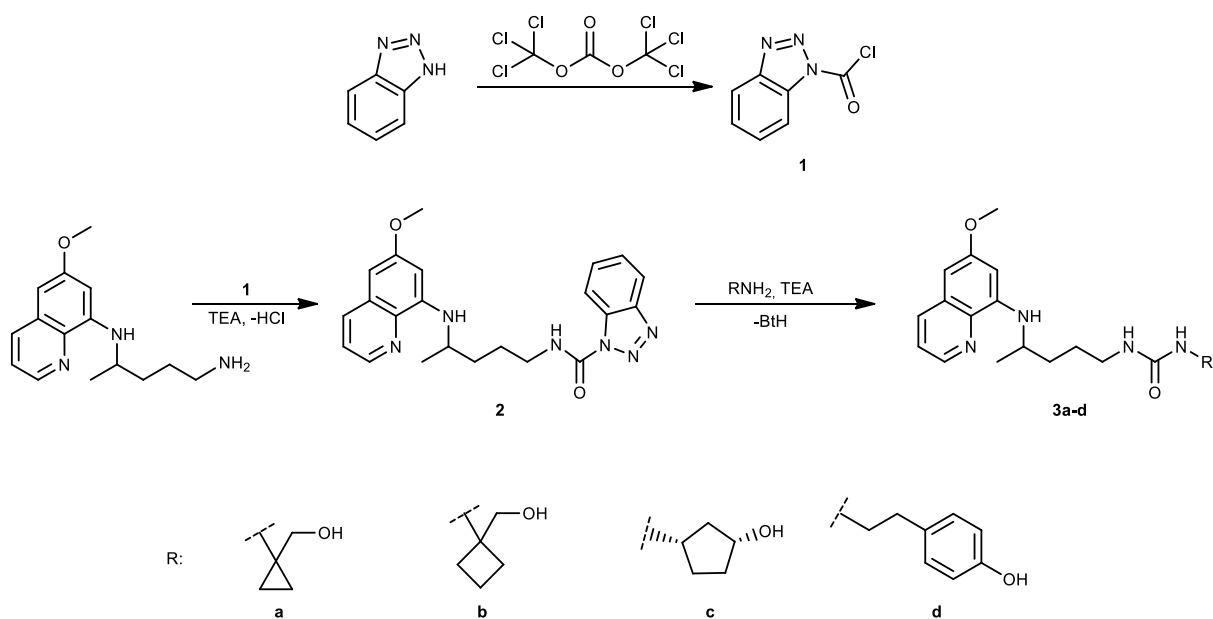
Sintetiziranim će ureama u daljnjim istraživanjima biti ispitano antiproliferativno i antimalarijsko djelovanje.

Ključne riječi: primakin, urea, benzotriazol, mikrovalna sinteza

Synthesis and characterization of novel primaquine ureas with amino alcohols

This paper is a continuation of many years of research into primaquine derivatives as antitumor drugs at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Based on the results of these studies, novel primaquine ureas containing a cyclic aliphatic or aromatic amino alcohol in the structure have been designed as potential cytostatics and antimalarials.

Within this work, the benzotriazole method was used for the synthesis of four new primaquine ureas with amino alcohol moieties in their structures **3a-d**. Structures of the newly prepared compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR, MS). Melting points of the solid compounds were also determined.



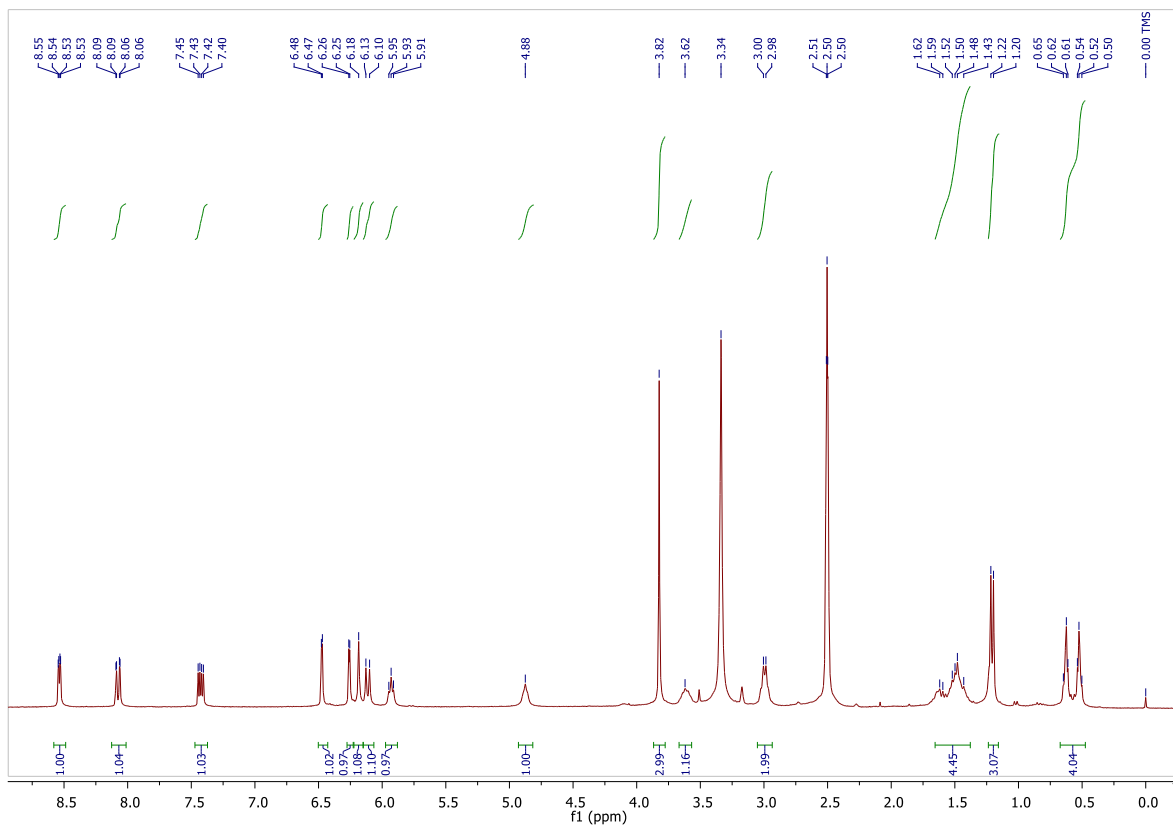
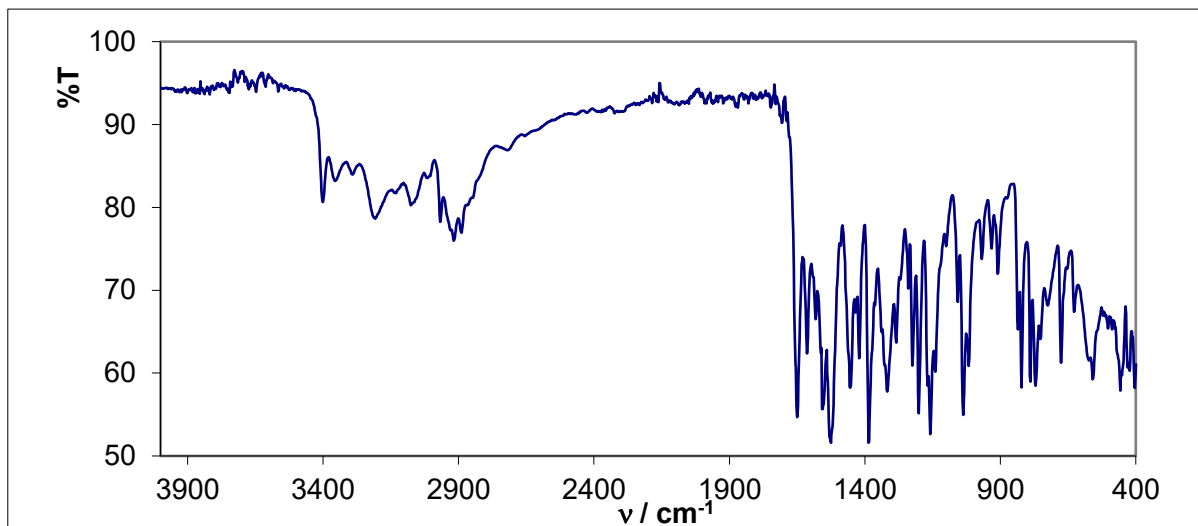
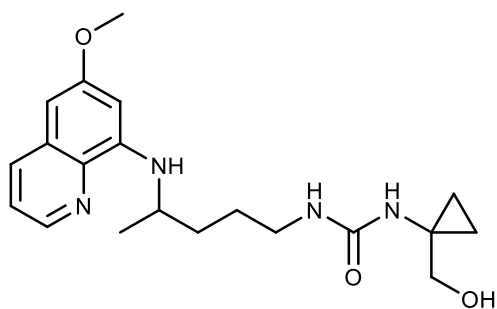
All four novel derivatives meet all of the Lipinski and Veber criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME web tool predicts good oral bioavailability of all four derivatives, but it also predicts that compounds **3a-c** are P-glycoprotein substrates, which could potentially limit their anticancer efficacy.

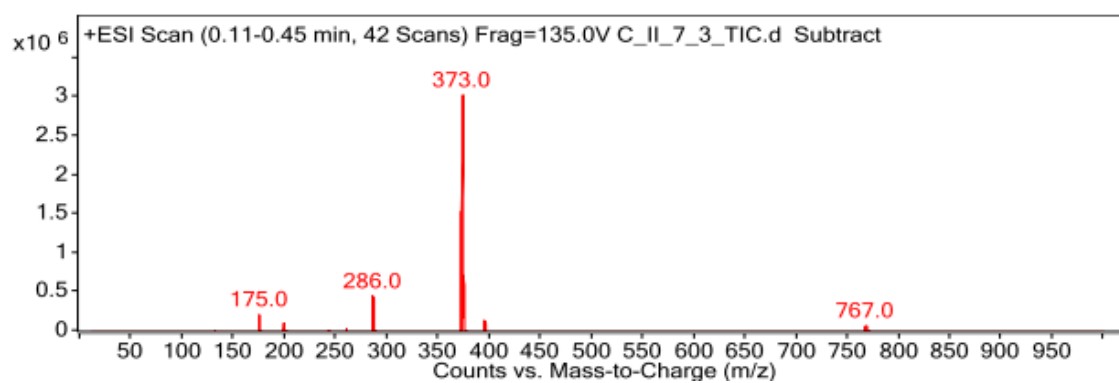
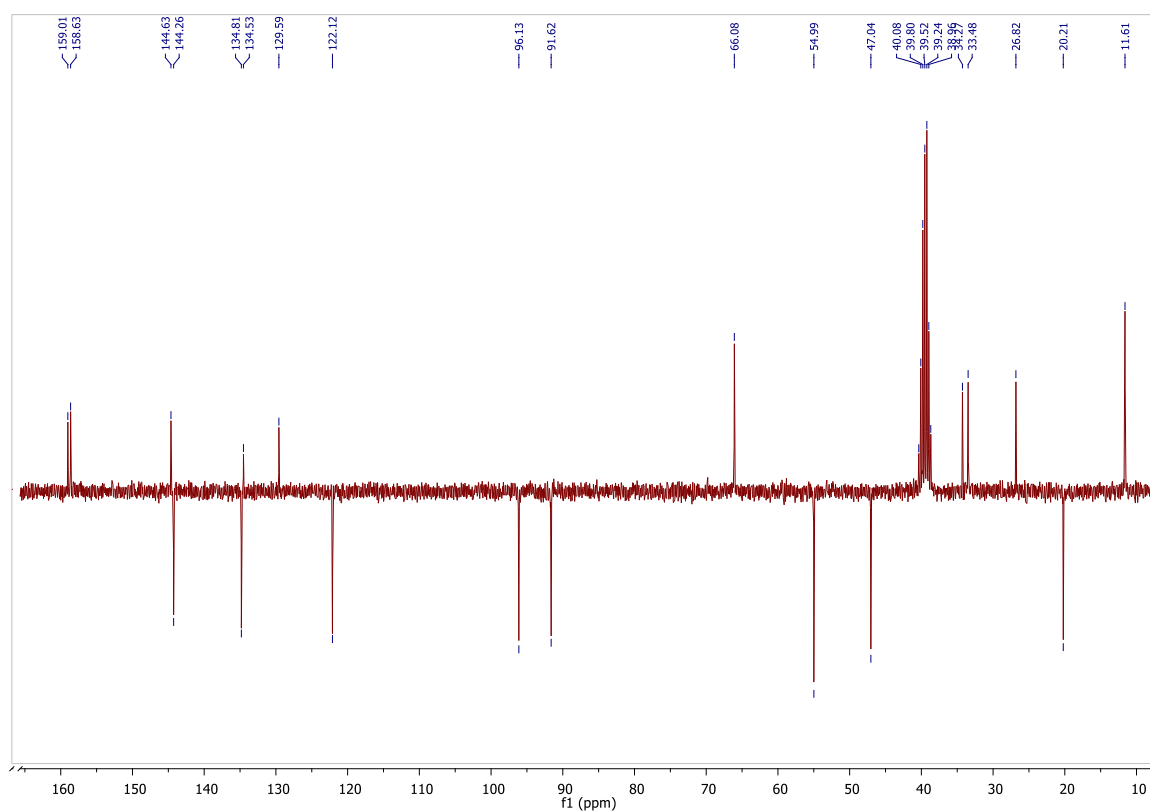
Further studies will investigate antiproliferative and antimalarial activity of the synthesized primaquine derivatives.

Keywords: primaquine, urea, benzotriazole, microwave, synthesis

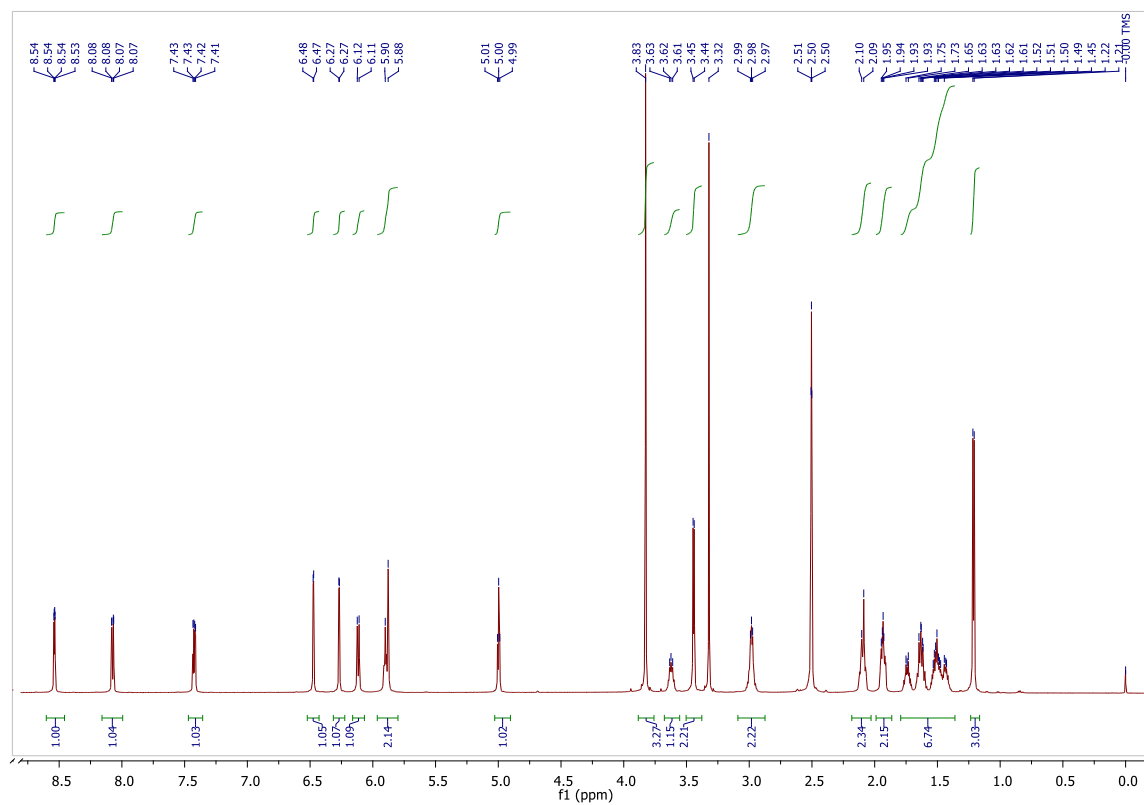
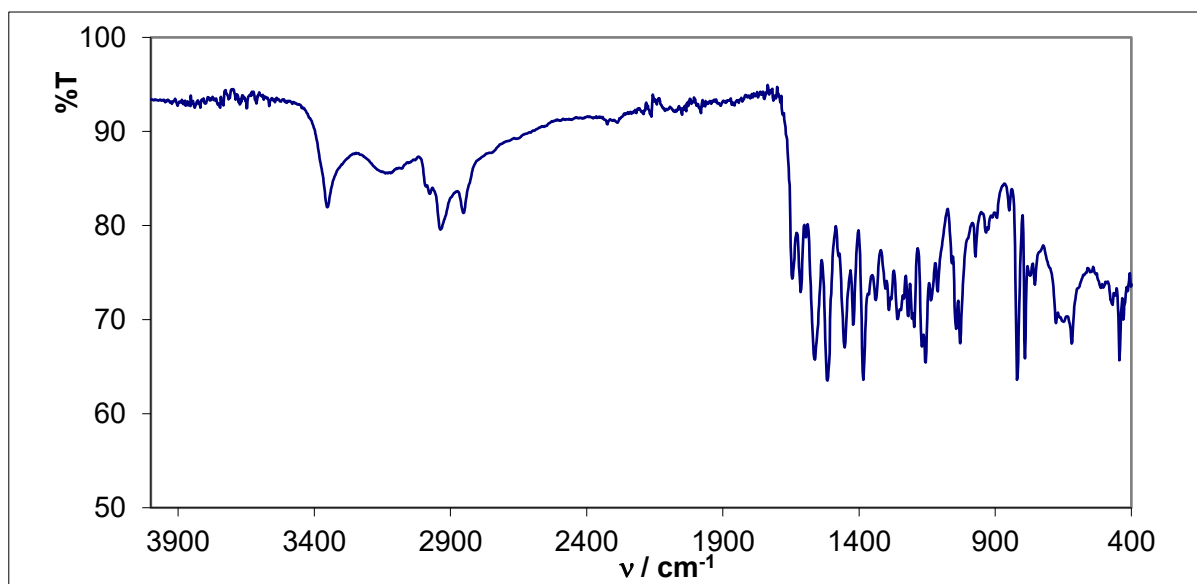
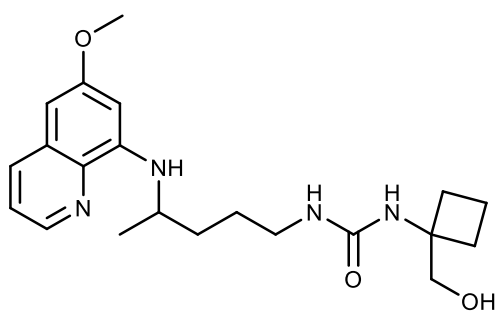
8. PRILOZI

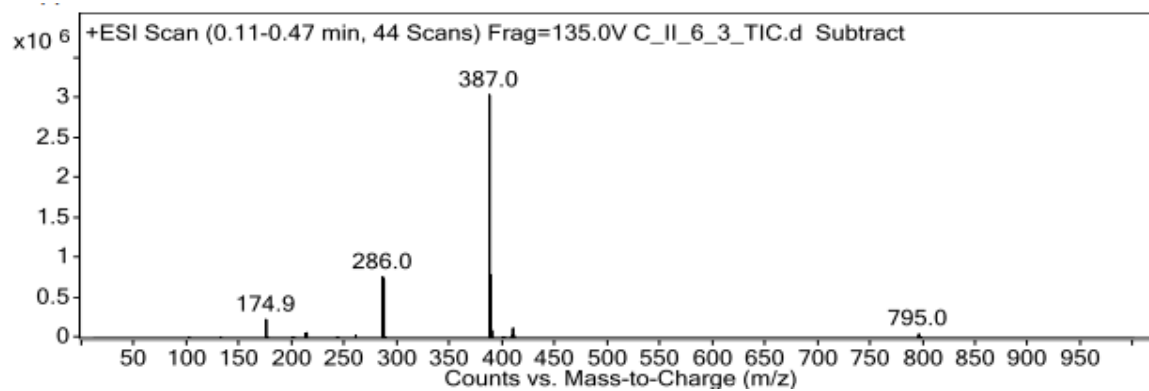
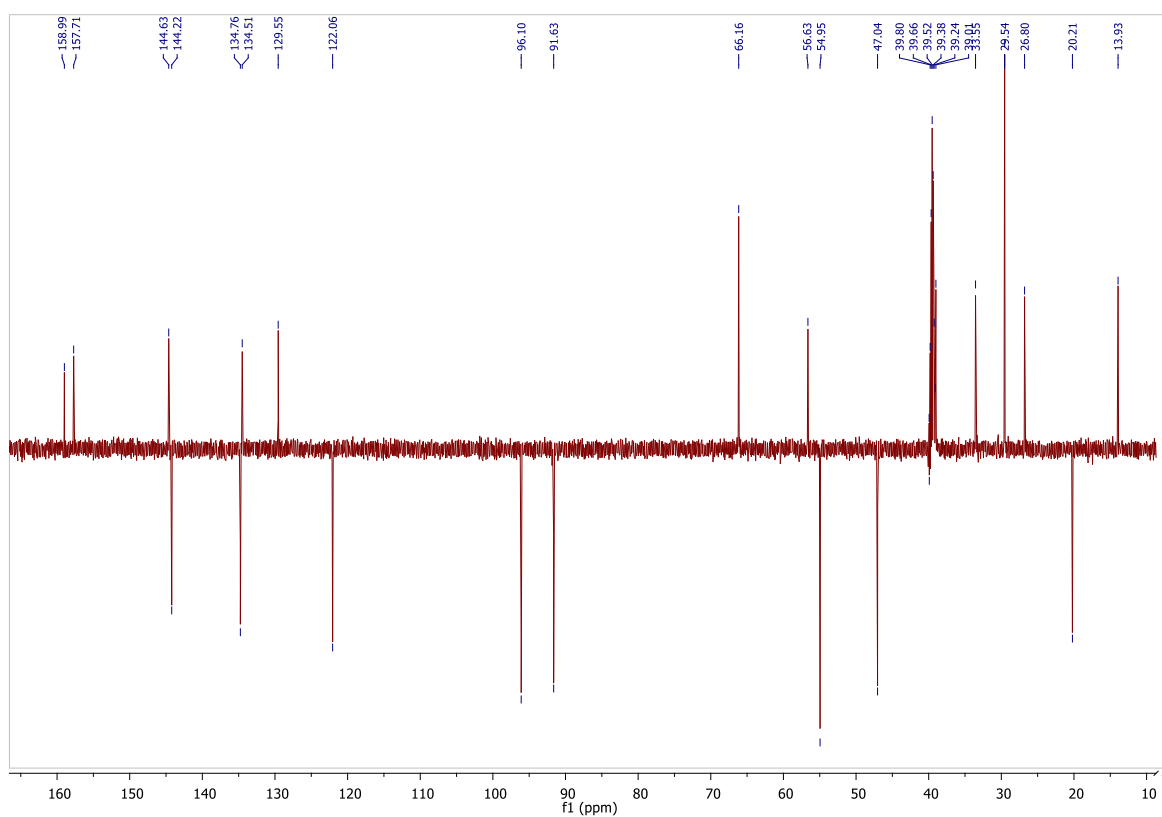
Prilozi sadrže IR, ^1H i ^{13}C NMR te MS spektre novosintetiziranih urea primakina.

3a

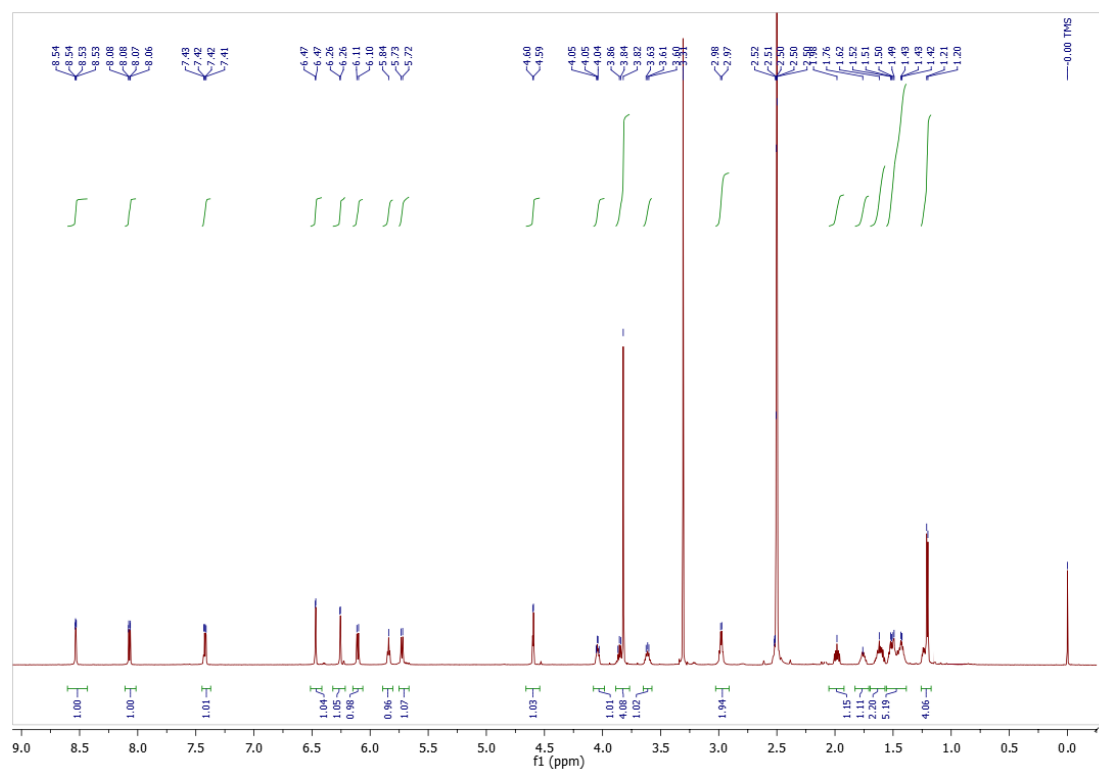
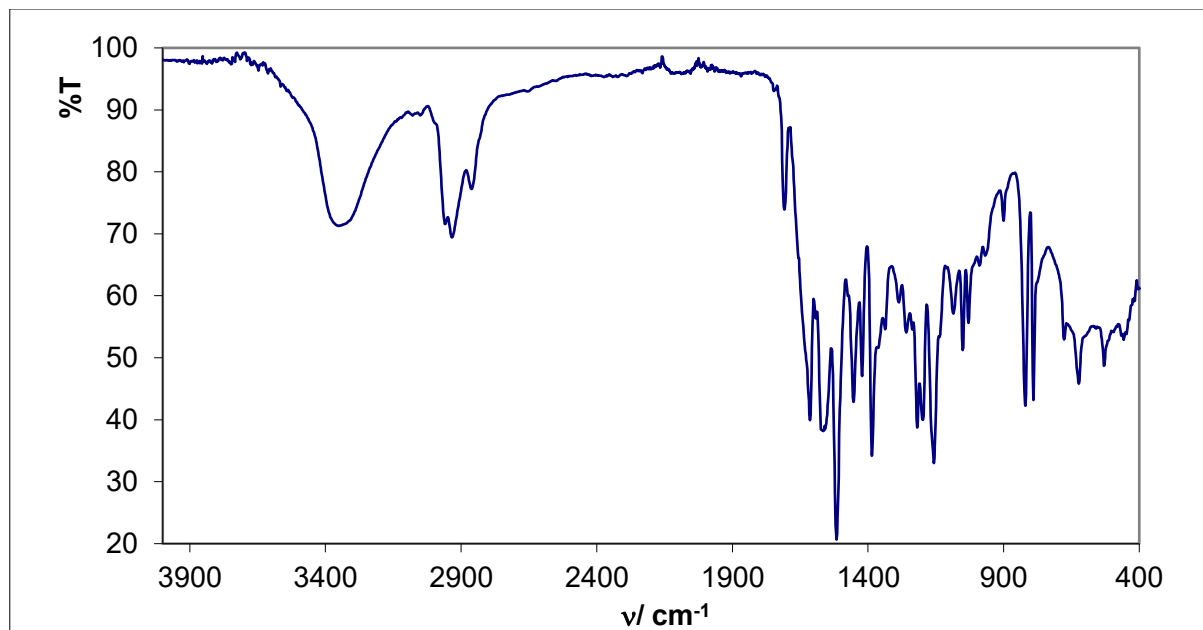
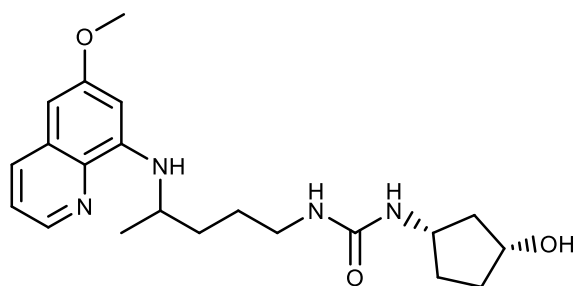


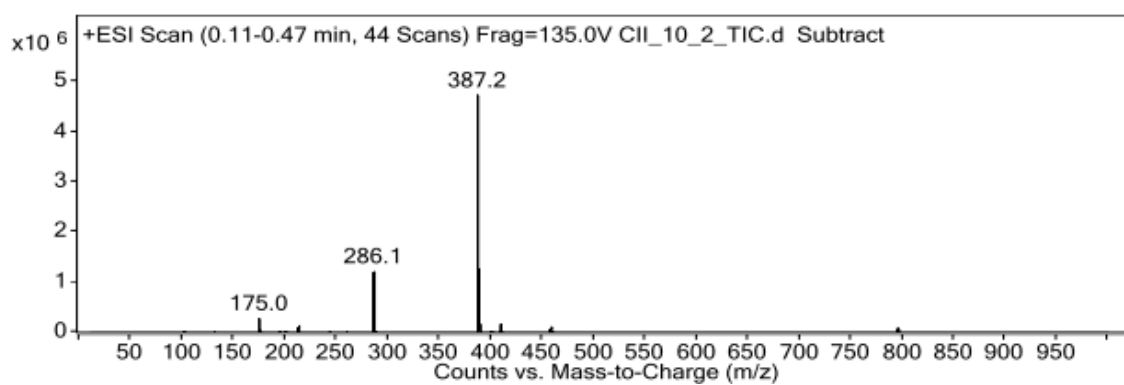
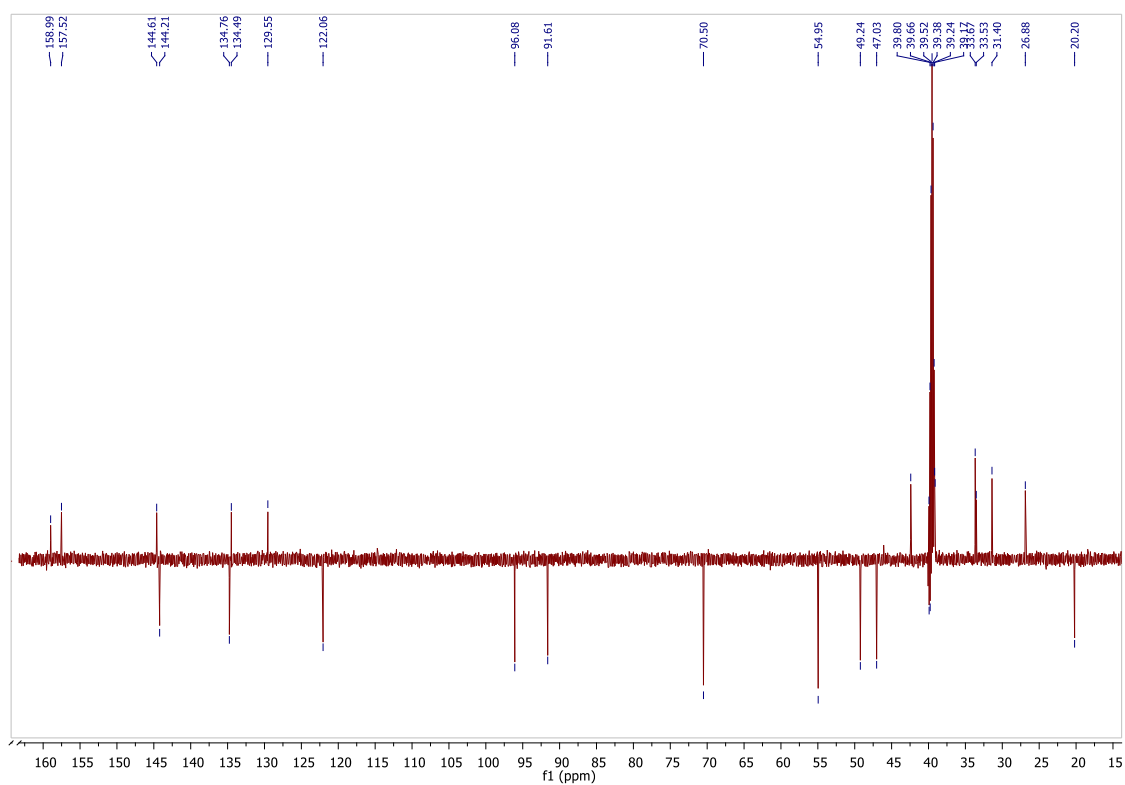
3b



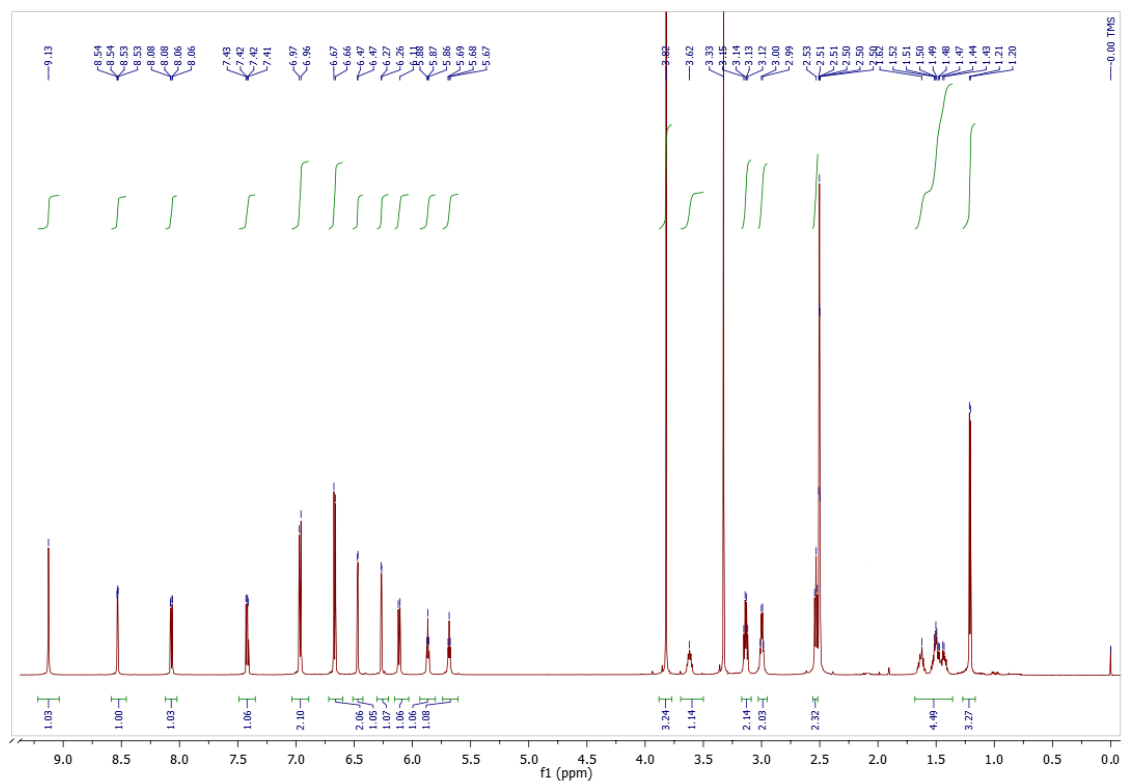
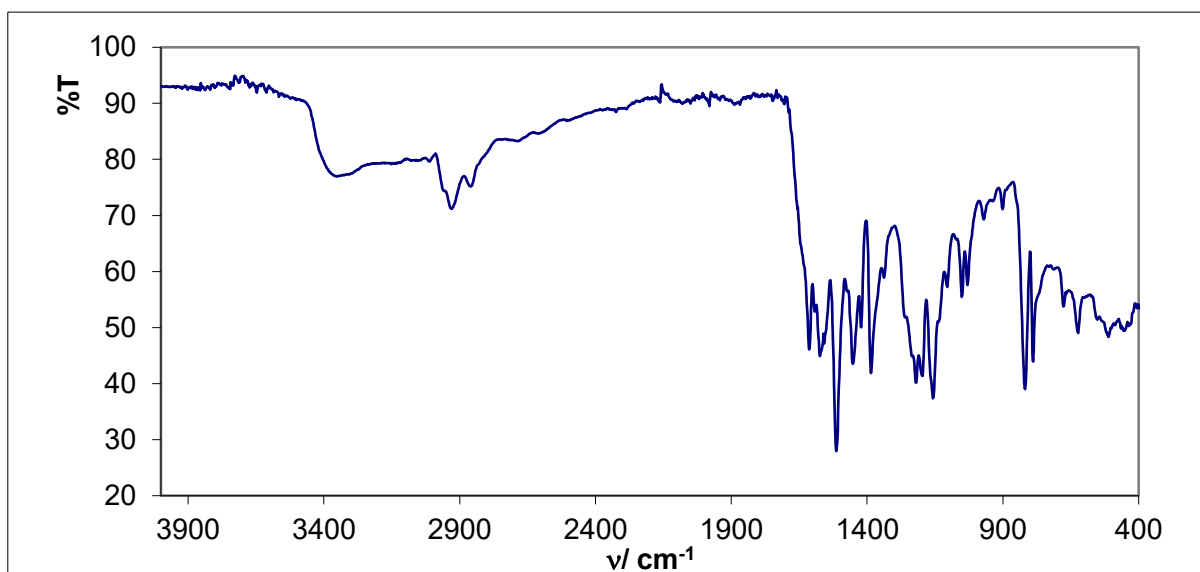
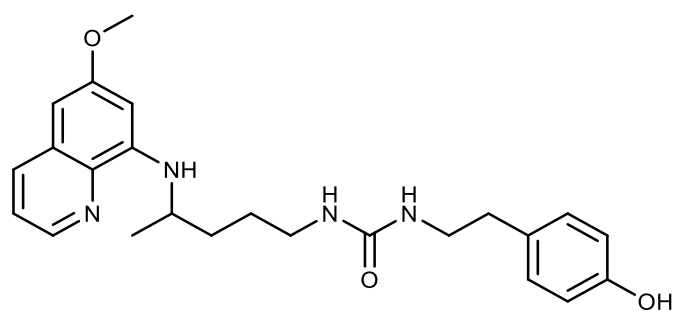


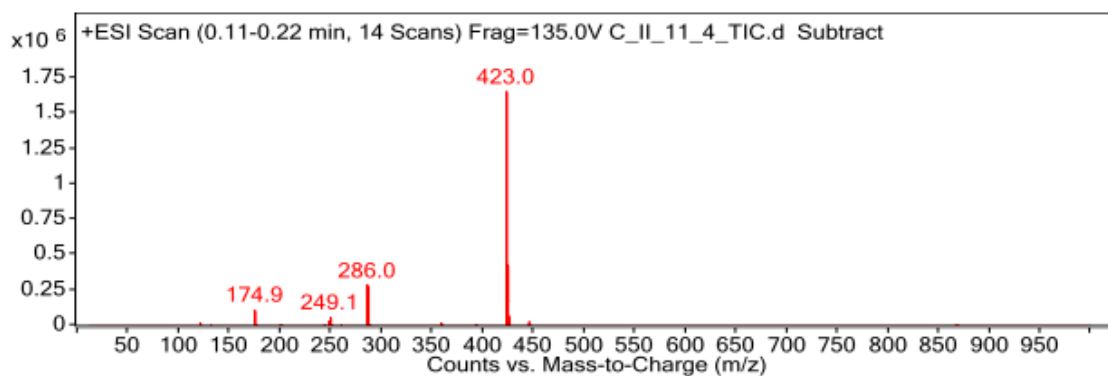
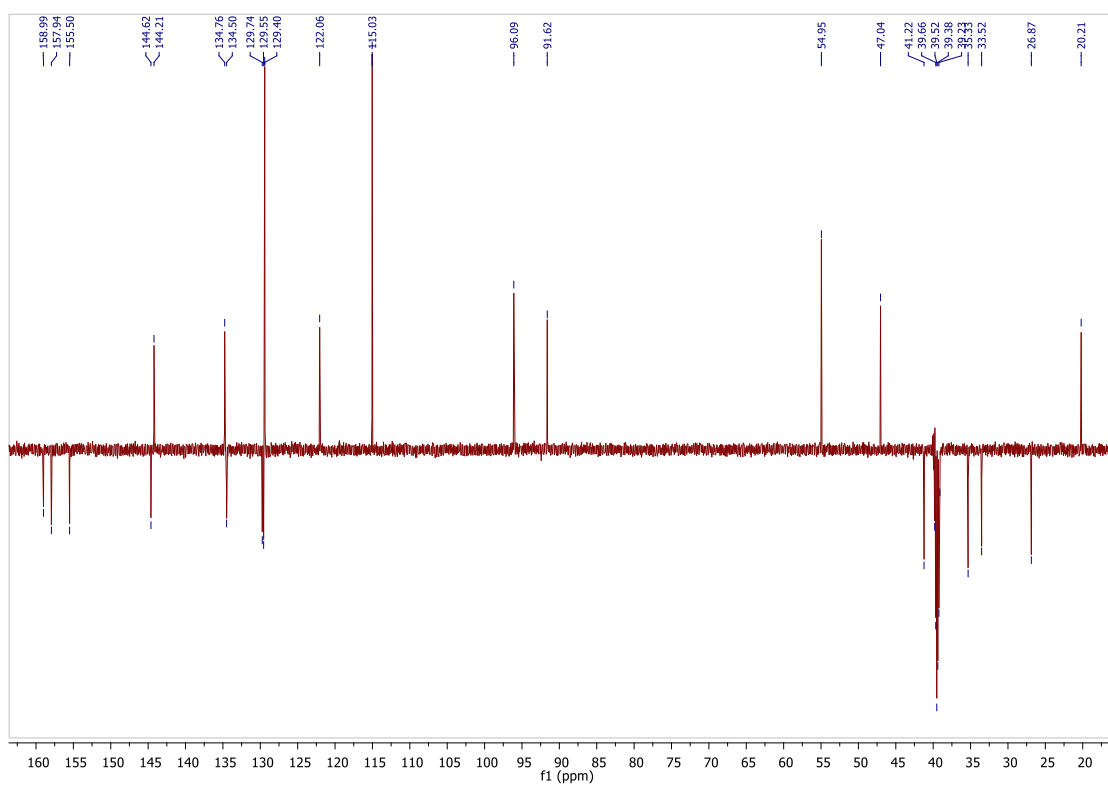
3c





3d





9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA NOVIH UREA PRIMAKINA S AMINOALKOHOLIMA

Jure Boras

SAŽETAK

Ovaj rad nastavak je višegodišnjih istraživanja derivata primakina kao antiproliferativnih lijekova u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Temeljem rezultata tih istraživanja dizajnirane su kao potencijalni citostatici i antimalarici nove uree primakina koje u strukturi sadrže ciklički alifatski aminoalkohol ili fenol.

U okviru ovog rada sintetizirana su benzotriazolskom metodom četiri nove uree primakina s aminoalkoholima **3a-d**. Svim novosintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ^1H ^{13}C NMR, MS), a krutim je produktima određena i temperatura tališta.

Sva četiri spoja zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, a dobru oralnu bioraspoloživost predviđa im i alat SwissADME. Isti alat predviđa da su spojevi **3a-c** supstrati P-glikoproteina, što može umanjiti njihov antitumorski učinak.

Sintetiziranim će ureama u daljnjim istraživanjima biti ispitano antiproliferativno i antimalarijsko djelovanje.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 63 stranice, 19 grafičkih prikaza, 5 tablica i 90 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: primakin, urea, benzotriazol, mikrovalna sinteza

Mentor: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Branka Zorc, *redovita profesorica u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Miranda Sertić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medicinal Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NOVEL PRIMAQUINE UREAS WITH AMINO ALCOHOLS

Jure Boras

SUMMARY

This paper is a continuation of many years of research into primaquine derivatives as antitumor drugs at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Based on the results of these studies, novel primaquine ureas containing a cyclic aliphatic or aromatic amino alcohol in the structure have been designed as potential cytostatics and antimalarials.

Within this work, the benzotriazole method was used for the synthesis of four new primaquine ureas with amino alcohol moieties in their structures **3a-d**. Structures of the newly prepared compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR, MS). Melting points of the solid compounds were also determined.

All four novel derivatives meet all of the Lipinski and Veber criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME web tool predicts good oral bioavailability of all four derivatives, but it also predicts that compounds **3a-c** are P-glycoprotein substrates, which could potentially limit their anticancer efficacy.

Further studies will investigate antiproliferative and antimalarial activity of the synthesized primaquine derivatives.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 63 pages, 19 figures, 5 tables and 90 references. Original is in Croatian language.

Keywords: primaquine, urea, benzotriazole, microwave, synthesis

Mentor: **Zrinka Rajić, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Zrinka Rajić, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Branka Zorc, Ph.D., *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, Ph.D., *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.